



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RITA DE CASSIA ZACARDI DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO DA AYAHUASCA USANDO  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS: QUANTIFICAÇÃO DE  
PRINCÍPIOS ATIVOS E *FINGERPRINTING***

**CAMPINAS**

**2018**

**RITA DE CASSIA ZACARDI DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO DA AYAHUASCA USANDO ESPECTROMETRIA DE  
MASSAS: QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS E *FINGERPRINTING***

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutora em Ciências.**

**Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Sussulini  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin**

**O arquivo digital corresponde à versão final da tese defendida pela aluna  
Rita de Cassia Zacardi de Souza e orientada pela profa. Dra. Alessandra  
Sussulini.**

**CAMPINAS**

**2018**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

So89c Souza, Rita de Cassia Zacardi, 1977-  
Caracterização da ayahuasca usando espectrometria de massas :  
quantificação de princípios ativos e fingerprinting / Rita de Cassia Zacardi de  
Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Alessandra Sussulini.  
Coorientador: Marcos Nogueira Eberlin.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Química.

1. Ayahuasca. 2. Psicotrópicos. 3. Validação. 4. Cromatografia líquida de  
ultra eficiência (CLUE). 5. Espectrometria de massas. I. Sussulini, Alessandra,  
1981-. II. Eberlin, Marcos Nogueira, 1959-. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Characterization of ayahuasca by mass spectrometry :  
quantification of active principles and fingerprinting analysis

**Palavras-chave em inglês:**

Ayahuasca

Psychotropic drugs

Validation

Ultra-high performance liquid chromatography

Mass spectrometry

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Alessandra Sussulini [Orientador]

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Marili Villa Nova Rodrigues

Palimécio Gimenes Guerrero Júnior

Aline Klassen

**Data de defesa:** 23-08-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (Orientadora)

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya (FCF-UNICAMP)

Profa. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues (CPQBA-UNICAMP)

Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Júnior (UTFPR-Curitiba)

Profa. Dra. Aline Klassen (UNIFESP-Diadema)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo(a) aluno(a) **RITA DE CASSIA ZACARDI DE SOUZA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar com os mais especiais agradecimentos à minha orientadora profa. Dra. Alessandra Sussulini pela orientação, confiança e pela paciência e amizade.

Agradeço ao prof. Dr. Marcos Eberlin pela coorientação e pelo apoio neste trabalho.

Agradeço ao aluno Luiz Novaes e ao prof. Dr. Julio Pastre do IQ- Unicamp pela colaboração no fornecimento dos padrões utilizados neste trabalho.

Gostaria de agradecer ao aluno de iniciação Donizete Freitas pela incansável ajuda no desenvolvimento deste trabalho, sua experiência na área de validação de métodos foi extremamente importante para a realização dos experimentos.

Gostaria de agradecer à técnica Priscila Andrade por todo seu apoio na utilização dos equipamentos e aos colegas de laboratório, em especial ao Henrique e à Flávia pela ajuda com o tratamento dos dados e organização dos resultados.

Agradeço ao prof. Luiz Fernando Tófoli e ao prof. Luiz Fernando Milanez, pelo apoio para a coleta das amostras e aos membros do Centro da UDV pelo fornecimento das amostras e pela acolhida durante o acompanhamento do preparo.

Agradecimentos também à Camila Dias, ao Edilson Rui, à Helle, às minhas amigas Valéria, Carol e Regina.

Agradeço aos meus pais, Alair e Antonio, e às minhas irmãs Raquel e Renata, pelo apoio e amor incondicionais. À minha sogra Vera pelo apoio e ao meu amado marido Alexandre pelo companheirismo e pelo incentivo diário. Amo muito todos vocês.

E por fim um especial agradecimento a minha amiga Adriana Schiozer pela amizade e apoio imensuráveis do início ao fim deste trabalho.

## RESUMO

As substâncias psicoativas, também conhecidas como psicodélicas ou alucinógenas, têm sido estudadas como potenciais terapêuticos no tratamento do uso abusivo de álcool e outras drogas desde os anos 1950. Nos anos 1970, devido ao seu uso recreativo abusivo, estas substâncias foram consideradas também drogas de abuso e as pesquisas nesta área foram abandonadas. Somente nos anos 1990, os estudos com substâncias psicodélicas foram retomados. Existem relatos de sucesso do uso de psicodélicos no tratamento de ansiedade e depressão. Neste contexto, o estudo de substâncias psicodélicas naturais tem recebido um importante destaque, principalmente substâncias de uso tradicional.

Um crescente número de estudos indica um grande potencial de uso terapêutico da ayahuasca, uma bebida com propriedades psicoativas preparada a partir da decocção de plantas amazônicas e utilizada, de forma legalizada, nas cerimônias religiosas de grupos sincréticos em todo o Brasil, EUA e Europa. Os principais interesses do uso da bebida estão nos tratamentos de adições em geral (álcool, tabaco e drogas ilícitas como cocaína e heroína), além do seu uso no tratamento de pacientes que apresentam depressão e ansiedade. O uso da ayahuasca como medicamento natural ou fitoterápico está diretamente ligado à ação de seus ativos e sua ligação com a eficiência terapêutica da bebida. Informações sobre a variação dos ativos nos extratos são importantes para auxiliar na produção de um produto padronizado.

Neste trabalho, foram realizadas análises de quantificação dos quatro principais princípios ativos da ayahuasca (*N,N*-dimetiltryptamina, tetraidroarmina, harmina e harmalina) em amostras reais utilizadas em contexto ritual em grupos ayahuasqueiros do Estado de São Paulo e em amostras coletadas na Europa, utilizadas por grupos tradicionais e não tradicionais. Para tanto, um método utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) foi desenvolvido e validado para sua aplicação em amostras de ayahuasca.

A partir do método validado, foram analisadas 38 amostras diferentes de ayahuasca provenientes do Estado de São Paulo e 40 amostras de ayahuasca coletadas na Europa e provenientes de países como Estônia e Itália. Além da

quantificação dos ativos, foi realizada a avaliação dos perfis das amostras por meio de análises por UHPLC-MS/MS com foco na análise de *fingerprinting*.

Nas amostras coletadas na Europa, além da avaliação dos perfis, foi realizada também uma investigação a fim de confirmar a presença de possíveis contaminantes, tanto sintéticos como naturais, prática comum em alguns grupos ayahuasqueiros não tradicionais, principalmente fora do Brasil. Por meio de análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), espectrometria de massas de alta resolução simples e sequencial (HRMS e HR-MS/MS), foi possível detectar a presença de substâncias sintéticas e naturais em parte das amostras da Europa.

Por fim, foi realizado o acompanhamento do preparo real da ayahuasca em duas ocasiões distintas e a cinética de extração, por meio da quantificação dos ativos, foi realizada. Após a análise dos resultados, foram levantados pontos importantes que poderão, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de um produto padronizado, otimizando seu preparo e reduzindo os custos de produção, tornando ainda mais viável seu uso terapêutico.

## ABSTRACT

Psychoactive substances, also known as psychedelic or hallucinogenic, have been studied as potential therapeutics for the treatment of abusive use of alcohol and other drugs since the 1950s. In the 1970s, due to their excessive recreational use, these substances were also considered drugs of abuse and research in this area has been abandoned. It was only in the 1990s that studies with psychedelic substances were recommenced. There have been reports of successful use of psychedelics in the treatment of anxiety and depression. In this context, the study of natural psychedelic substances has received an important emphasis, mainly substances of traditional use, due to its proven safety.

A growing number of studies indicate a great potential for therapeutic use of ayahuasca, a psychoactive beverage prepared from the decoction of plants and legally used in religious ceremonies of syncretic groups throughout Brazil, United States and Europe. The main interests in the use of this drink are in treatments of addictions in general (alcohol, tobacco and illicit drugs like cocaine and heroin), besides its use in the treatment of patients who present depression and anxiety. The use of ayahuasca as a natural or phytotherapeutic drug is directly linked to the action of its active principles and its connection with the therapeutic efficacy of the beverage. Information on active principles in extracts is important to assist the production of a standardized product.

In this work, quantification analyses of the four main ayahuasca actives (*N,N*-Dimethyltryptamine, Tetrahydroharmine, Harmine and Harmaline) were performed in real samples used in ritual context in groups in Brazil (São Paulo) and in samples collected in Europe, used by traditional and non-traditional groups. For this purpose, a method using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed and validated for its application in extract samples.

Using a validated method, 38 different samples of ayahuasca from São Paulo and 40 samples of ayahuasca collected in Europe and countries like Estonia and Italy were analyzed. In addition to the quantification of the actives, the chemical profiles of the samples were evaluated by LC-MS analyses focusing on fingerprinting.



In the samples collected in Europe, in addition to the profile evaluation, an investigation was also carried out in order to confirm the presence of possible contaminants, both synthetic and natural, common practice in some non-traditional ayahuasca groups, mainly outside Brazil. Using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), simple and sequential high resolution mass spectrometry (HRMS and HR-MS/MS), it was possible to detect the presence of synthetic and natural substances in some of the samples from Europe.

Finally, the preparation of ayahuasca was monitored on two different occasions, and the extraction kinetics, through the quantification of the actives, was performed. Analyzing the results, important points were raised that could in the future assist in the development of a standardized product, optimizing its preparation and reducing production costs, making its therapeutic use even more feasible.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos principais compostos ativos da ayahuasca, <i>N,N</i> -dimetiltryptamina <b>(1)</b> originários das folhas da <i>Psychotria viridis</i> e tetraidroarmina <b>(2)</b> , harmina <b>(3)</b> e harmalina <b>(4)</b> do cipó da <i>Banisteriopsis caapi</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura de alguns alcaloides utilizados na indústria farmacêutica, escopolamina <b>(6)</b> , Paclitaxel <sup>®</sup> (taxol) <b>(7)</b> , vimblastina <b>(8)</b> e vincristina <b>(9)</b> . ....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular da serotonina <b>(10)</b> em comparação com a estrutura do DMT <b>(1)</b> . ....	22
<b>Figura 4.</b> Espécies vegetais mais utilizadas na ayahuasca e seus principais ativos. ....	25
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ionização/dessorção por <i>electrospray</i> . ....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema de um analisador triplo quadrupolo. ....	30
<b>Figura 7.</b> Esquema de uma análise por SRM. ....	31
<b>Figura 8.</b> Cipó mariri <b>(A)</b> e folhas de chacrona <b>(B)</b> utilizadas em preparo da ayahuasca. ....	40
<b>Figura 9.</b> Preparo do tacho para decocção.....	41
<b>Figura 10.</b> Tachos na fornalha.....	41
<b>Figura 11.</b> Fluxograma do preparo da ayahuasca. ....	42
<b>Figura 12.</b> Estrutura molecular do cloridrato de difenidramina <b>(11)</b> usado como PI. ....	44
<b>Figura 13.</b> Cromatograma obtido na separação dos ativos da ayahuasca empregando-se UHPLC-MS/MS. Condições cromatográficas: volume de injeção 1 µL; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 4 min - 50:50 v/v; 5,5 min - 50:50 v/v; 6 min - 90:10 v/v. ....	49
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas obtidos na separação dos ativos da ayahuasca empregando-se UHPLC-MS/MS. Condições cromatográficas: volume de injeção 1 µL; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 4 min - 50:50 v/v; 5,5 min - 50:50 v/v; 6 min - 90:10 v/v. As condições de MS/MS estão descritas no item 3.3.2.....	50
<b>Figura 15.</b> Gráficos de dispersão de resíduos para os analitos estudados. ....	53
<b>Figura 16.</b> Dados da análise de variâncias (ANOVA) para os analitos estudados. ...	54

<b>Figura 17.</b> Representação das curvas de regressão linear para o teste de efeito matriz.	56
<b>Figura 18.</b> Gráfico da distribuição da concentração dos ativos nas amostras de ayahuasca de São Paulo.	63
<b>Figura 19.</b> Distribuição da concentração dos analitos DMT e THH nas amostras do Estado de São Paulo.	64
<b>Figura 20.</b> Distribuição da concentração dos analitos HME e HML nas amostras do Estado de São Paulo.	64
<b>Figura 21.</b> Gráfico da distribuição da concentração dos ativos nas amostras da Europa.	67
<b>Figura 22.</b> Gráficos da distribuição das concentrações de DMT e THH nas amostras da Europa (azul) vs. São Paulo (vermelho).	68
<b>Figura 23.</b> Gráficos da distribuição das concentrações de HME e HML nas amostras da Europa (azul) vs. São Paulo (vermelho).	68
<b>Figura 24.</b> Distribuição da concentração dos analitos DMT e THH nas amostras da Europa.	69
<b>Figura 25.</b> Distribuição da concentração dos analitos HME e HML nas amostras da Europa.	69
<b>Figura 26.</b> Cromatograma obtido empregando-se LC-MS para uma amostra de ayahuasca. Condições cromatográficas: volume de injeção 1 µL; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 10 min - 10:90 v/v; 11 min - 90:10 v/v.	71
<b>Figura 27.</b> Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises de LC-MS das amostras de São Paulo (SP) x Europa (EST).	72
<b>Figura 28.</b> Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras preparadas em São Paulo (SP) avaliando-se o Mariri ( <i>B.caapi</i> ) vindo da região Norte (vermelho) com aquele da região Sudeste (verde) do Brasil.	73
<b>Figura 29.</b> Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras de São Paulo (SP) avaliando-se chacrona ( <i>P. viridis</i> ) vindo da região Norte (vermelho) com aquele da região Sudeste (verde).	74

<b>Figura 30.</b> Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras de São Paulo (SP) avaliando-se a variedade de chacrona ( <i>P. viridis</i> ) utilizada no preparo, sendo Caupuri (vermelho) Tucunacá (verde) e ambas (azul).....	75
<b>Figura 31.</b> Estrutura molecular da mescalina (12).....	76
<b>Figura 32.</b> Estrutura molecular da yuremamina (13). ....	78
<b>Figura 33.</b> Estrutura molecular da moclobemida (14).....	78
<b>Figura 34.</b> Estrutura molecular da psilocina (15). ....	79
<b>Figura 35.</b> Espectro de massas de HRMS para as amostras EST03 evidenciado o íon de $m/z$ 212,1275, compatível com a massa da molécula protonada da mescalina...79	
<b>Figura 36.</b> Espectro de massas de HRMS para as amostras EST15 (A) e EST 25 (B) onde estão evidenciados os íons de $m/z$ 269 e $m/z$ 477 compatíveis com a massa molecular das moléculas protonadas das substâncias moclobemida e yuremamina, respectivamente. ....	80
<b>Figura 37.</b> Comparação do modelo isotópico da molécula protonada da moclobemida ( $C_{13}H_{18}N_2ClO_2$ ) (A) com o íon encontrado no espectro obtido para a amostra EST15 (B). ....	81
<b>Figura 38.</b> Espectro de massas de HRMS para a amostra EST15, onde está evidenciado o de $m/z$ 205,1333, compatível com a massa da molécula protonada da psilocina. ....	81
<b>Figura 39.</b> Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon $m/z$ 212 indicando presença de mescalina na amostra EST03. ....	82
<b>Figura 40.</b> Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da mescalina. .	82
<b>Figura 41.</b> Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon $m/z$ 477,2023 indicando presença de yuremamina na amostra EST15. ....	82
<b>Figura 42.</b> Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da yuremamina. ....	83
<b>Figura 43.</b> Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon $m/z$ 269 indicando presença de moclobemida na amostra EST15. ....	83
<b>Figura 44.</b> Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da moclobemida. ....	84
<b>Figura 45.</b> Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon $m/z$ 205 indicando presença de psilocina na amostra EST15.....	84

<b>Figura 46.</b> Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da psilocina. ...	84
<b>Figura 47.</b> Gráfico de cinética de extração dos ativos no preparo da ayahwasca no dia 17/09/2016. ....	85
<b>Figura 48.</b> Gráfico de cinética de extração dos ativos no preparo da ayahwasca no dia 02/09/2017. ....	85
<b>Figura 49.</b> Gráficos individuais para cada ativo no ensaio de cinética de extração durante o preparo da ayahwasca (17/09/2016). ....	86
<b>Figura 50.</b> Gráficos individuais para cada ativo no ensaio de cinética de extração durante o preparo da ayahwasca (02/09/2017). ....	87
<b>Figura 51.</b> Redução química da HME e HML a THH em meio ácido.....	88

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais parâmetros a serem validados de acordo com as características da análise: .....	34
<b>Tabela 2.</b> Amostras de ayahuasca do Estado de São Paulo .....	37
<b>Tabela 3.</b> Amostras de ayahuasca do grupo da Europa* .....	39
<b>Tabela 4.</b> Concentração das soluções padrão estoque .....	44
<b>Tabela 5.</b> Concentração dos pontos das curvas analíticas .....	45
<b>Tabela 6.</b> Condições utilizadas para a etapa cromatográfica na quantificação dos ativos da ayahuasca.....	46
<b>Tabela 7.</b> Condições instrumentais para análise por espectrometria de massas .....	47
<b>Tabela 8.</b> Condições SRM para cada analito.....	47
<b>Tabela 9.</b> Condições utilizadas para a etapa cromatográfica nas análises de LC-MS .....	48
<b>Tabela 10.</b> Dados de linearidade para os quatro analitos estudados .....	52
<b>Tabela 11.</b> Razão entre os coeficientes angulares das curvas (avaliação do efeito matriz) .....	57
<b>Tabela 12.</b> Valores das soluções de controle de qualidade (CQ) utilizados na validação .....	59
<b>Tabela 13.</b> Dados de precisão para os quatro analitos estudados .....	59
<b>Tabela 14.</b> Dados de exatidão para os quatro analitos estudados .....	60
<b>Tabela 15.</b> Dados de robustez para os quatro analitos estudados (vazão da fase móvel) .....	61
<b>Tabela 16.</b> Dados de robustez para os quatro analitos estudados (temperatura da coluna) .....	61
<b>Tabela 17.</b> Variação da concentração dos ativos em amostras de plantas de <i>Banisteriopsis caapi</i> e <i>Psychotria viridis</i> (retirado de Callaway <i>et al.</i> ) .....	65
<b>Tabela 18.</b> Comparação da concentração dos ativos em amostras de ayahuasca utilizando diferentes técnicas de análise (literatura) .....	70

## Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 – Octadecil, C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>

CID - *Collision-induced dissociation* - dissociação induzida por colisão

CV – Coeficiente de variação

DMT - *N,N*-dimetiltryptamina

ESI - *Electrospray ionization* - Ionização por *electrospray*

FE - Fase estacionária

FM - Fase móvel

GC-NPD - *Gas chromatography coupled to nitrogen-phosphorus detector* - Cromatografia a gás acoplada a detector de nitrogênio-fósforo

HME - Harmina

HML - Harmalina

HPLC - *High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência

INCB - *International Narcotics Control Board*

IR – *Infrared* - Infravermelho

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LC – *Liquid chromatography* - Cromatografia líquida

LC-MS – *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry* - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

*m/z* – Relação massa/carga

MS - *Mass spectrometry* - Espectrometria de massas

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* – Ressonância Magnética Nuclear

PLS-DA - *Partial least squares-discriminant analysis* - Regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante

QTOF – *Quadrupole time-of-flight* - Quadrupolo tempo de voo

r – Coeficiente de variação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RSD – Desvio padrão relativo

s – Estimativa do desvio padrão

SRM – *Selected reaction monitoring* - Monitoramento de reações selecionadas

THH - Tetraidroharmina

UHPLC-MS/MS – *Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry* – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 A ayahuasca .....	18
1.2 Principais princípios ativos da ayahuasca.....	19
1.2.1 Alcaloides.....	20
1.2.2 <i>N,N</i> -dimetiltryptamina (DMT) e as beta-carbolinas .....	22
1.3 Efeitos fisiológicos da ayahuasca .....	25
1.4 Uso terapêutico da ayahuasca.....	26
1.5 Métodos de análise aplicados ao estudo da ayahuasca .....	27
1.5.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS).....	27
1.5.2 Monitoramento de reações selecionadas (SRM) .....	30
1.6 <i>Fingerprinting</i> e Quimiometria.....	32
1.7 Validação do método analítico .....	33
2. OBJETIVOS .....	35
2.1 Objetivos específicos .....	35
3. EXPERIMENTAL .....	35
3.1 Amostras de ayahuasca analisadas .....	35
3.1.1 Amostras do Estado de São Paulo .....	36
3.1.2 Amostras da Europa .....	38
3.1.3 Amostras para avaliação da cinética de extração da ayahuasca.....	40
3.2 Procedimento Experimental.....	43
3.2.1 Materiais e reagentes .....	43
3.2.2 Equipamentos e instrumentação.....	43
3.2.3 Preparo da curva analítica .....	44
3.2.4 Preparo das amostras para injeção .....	45
3.3 Condições instrumentais para determinação quantitativa dos ativos.....	45
3.3.1 Otimização das condições cromatográficas.....	45
3.3.2 Otimização das condições espectrométricas .....	46
3.4 Condições instrumentais para análise qualitativa das amostras (LC-MS baixa resolução) .....	47
3.5 Condições instrumentais para análise qualitativa das amostras (HRMS) .	48



4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.1	Otimização das condições de análise .....	49
4.1.1	Separação cromatográfica dos ativos .....	49
4.2	Validação do método .....	50
4.2.1	Linearidade e faixa linear de trabalho .....	50
4.2.2	Seletividade e efeito matriz .....	54
4.2.3	Precisão .....	58
4.2.3.1	Repetibilidade (precisão intra-corridas).....	58
4.2.3.2	Precisão intermediária (precisão intercorridas).....	59
4.2.4	Exatidão .....	60
4.2.5	Robustez.....	60
4.3	Quantificação dos ativos .....	62
4.4	Avaliação do perfil químico das amostras de ayahuasca por LC-MS ( <i>fingerprinting</i> ).....	70
4.5	Investigação sobre a presença de adulterantes das amostras de ayahuasca da Europa .....	76
4.6	Cinética do preparo da ayahuasca .....	85
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	89
6.	REFERÊNCIAS.....	91
7.	ANEXOS.....	101

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A ayahuasca

A ayahuasca é uma bebida com propriedades psicoativas preparada a partir da decocção do cipó da planta *Banisteriopsis caapi*, também conhecida como mariri, com as folhas da *Psychotria viridis*, chamada popularmente de chacrona. Conhecida também como Hoasca, Caapi, Yagé e Vegetal,<sup>1,2</sup> esta bebida é utilizada nos chamados rituais xamânicos em toda a Amazônia há centenas ou talvez milhares de anos.<sup>3</sup> Atualmente, o chá é utilizado de forma legalizada nas cerimônias religiosas de grupos sincréticos em todo o Brasil, em alguns países da Europa e em alguns estados dos EUA.

Dentre as religiões que se utilizam desta bebida em seus rituais estão a União do Vegetal (UDV), a Barquinha e o Santo Daime, que são as mais conhecidas no Brasil.<sup>4</sup> A ayahuasca é utilizada nos rituais como meio de comunicação com o mundo espiritual. Acredita-se que seus efeitos psicoativos auxiliam no tratamento e cura das enfermidades e que seu efeito como enteógeno<sup>i</sup> provoca a ligação com uma divindade interna ou manifestação interior do divino.<sup>5</sup>

Seu consumo para fins religiosos foi autorizado por meio da resolução nº 5 do CONAD, atual Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), em 4 de novembro de 2004. Além do uso ritual, fica autorizado desde então seu uso em pesquisas científicas. Esta resolução também sugere a implantação de um grupo para estudo terapêutico com a ayahuasca, em caráter experimental.<sup>6</sup>

As substâncias psicoativas, também conhecidas como psicodélicas ou alucinógenas, naturais ou sintéticas, começaram a ser estudadas, principalmente entre os anos 50 e 60, como potenciais terapêuticos para tratamento de pessoas com adições em álcool e outras drogas de abuso. Estudos preliminares mostraram que experimentos utilizando LSD (dietilamida do ácido lisérgico) foram bem-sucedidos no tratamento de adictos em álcool<sup>7</sup> e segundo Bogenschutzev,<sup>8</sup> existem cerca de 30 artigos desta época que reportam estudos no tema. Porém, nos anos 70, o uso desta substância foi proibido por ter sido considerada nociva ao indivíduo, devido ao seu

---

<sup>i</sup> Enteógeno: diz-se das substâncias naturais alteradoras da consciência (psicodélicas) usadas em rituais espirituais.

uso recreativo abusivo.<sup>9</sup> Somente nos anos 90, estudos com substâncias psicodélicas foram retomados.

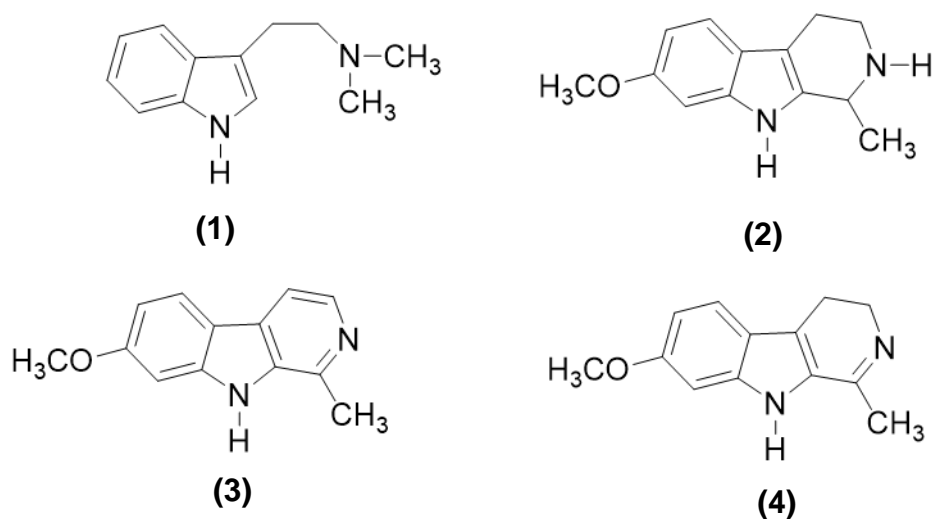
Existem também relatos de sucesso do uso de psicodélicos no tratamento de ansiedade e depressão. Grob *et al.*<sup>10</sup> relatam o uso da psilocibina, uma substância natural presente em algumas espécies de cogumelos, na diminuição da ansiedade em pacientes com câncer avançado. Um crescente número de estudos indica um grande potencial de uso terapêutico da ayahuasca.

Os principais interesses do uso da bebida estão nos tratamentos de adições em geral (álcool, tabaco e drogas ilícitas como cocaína e heroína),<sup>11,12,13</sup> mas são também levantadas as possibilidades do seu uso no tratamento de pacientes que apresentam depressão e ansiedade.<sup>14,15</sup>

Muitas publicações sugerem que a ayahuasca pode ser utilizada de forma segura em terapias psicodélicas. Santos *et al.*<sup>16</sup>, em uma revisão sobre os efeitos ansiolíticos e antidepressivos da ayahuasca e seus ativos isolados, fazem um levantamento dos estudos realizados com estas substâncias tanto em animais como em humanos, dentro e fora de um contexto religioso e apresentam cerca de 20 estudos com resultados positivos e promissores do uso da ayahuasca no tratamento da depressão e ansiedade.

## 1.2 Principais princípios ativos da ayahuasca

Os principais compostos ativos da ayahuasca são a *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (1) e as beta-carbolinas tetraidroharmina (THH) (2), harmina (HME) (3) e harmalina (HML) (4). Estes compostos integram uma classe maior de substâncias orgânicas conhecidas como alcaloides (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estrutura dos principais compostos ativos da ayahuasca, *N,N*-dimetiltryptamina **(1)** originários das folhas da *Psychotria viridis* e tetraidroarmina **(2)**, harmina **(3)** e harmalina **(4)** do cipó da *Banisteriopsis caapi*.

### 1.2.1 Alcaloides

Os alcaloides são metabólitos secundários<sup>ii</sup> de plantas que formam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas. A similaridade molecular mais significativa desta classe é a presença de nitrogênio, seja ele heterocíclico ou não, na forma de amina.<sup>17,18</sup>

Os alcaloides compõem um dos maiores grupos entre os produtos naturais, sendo classificados de acordo com as similaridades estruturais, podendo ser encontrados predominantemente nas plantas, mas ocorrem também em fungos e alguns animais, como sapos e borboletas.<sup>17,19,20</sup>

As funções biológicas atribuídas aos alcaloides, quando produzidos por organismos, na maioria das vezes, são destinadas à autopreservação, defesa, inibição de competição ou comunicação.<sup>21</sup> O alcaloide lupina, por exemplo, tem a função de substância protetora contra predadores em algumas espécies do gênero

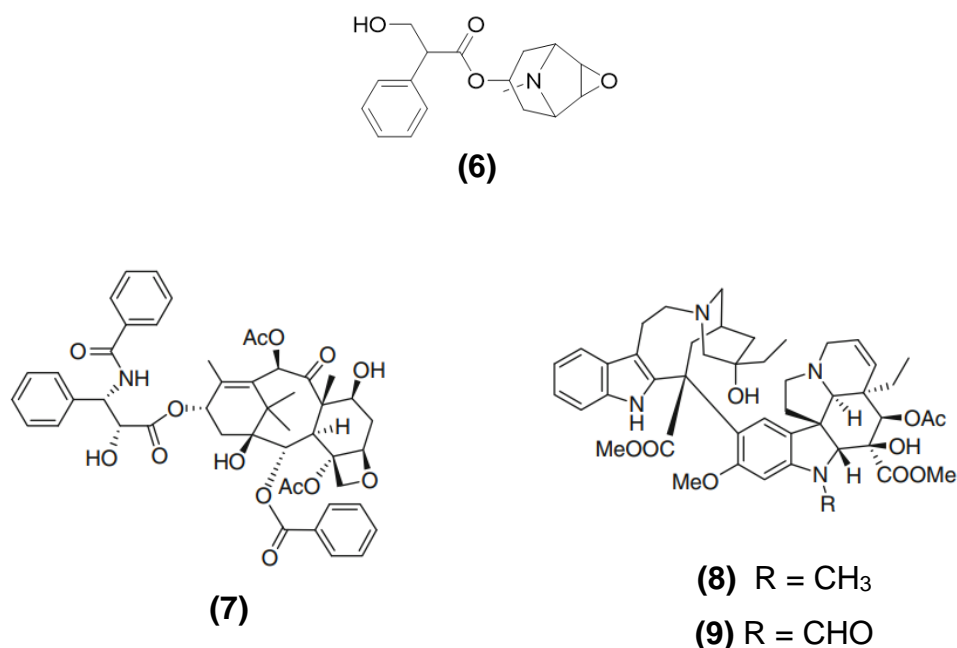
---

<sup>ii</sup> Metabólitos secundários: compostos orgânicos produzidos pelas plantas e que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução mas têm papel importante para a propagação e sobrevivência das espécies (mecanismos de defesa, proteção contra herbivoria e ataque de patógenos, competição entre plantas, atração de polinizadores, etc.)

*lupinus*. Outro exemplo é colchicina, que possui função reguladora do crescimento nas plantas da espécie *Colchicum autumnale*.<sup>22</sup>

Muitos alcaloides são tóxicos, alguns, como os pirrolizidínicos, por exemplo, estão entre os mais nocivos, podendo causar problemas no fígado, depressão do sistema respiratório, anomalias e malformações, e até câncer.<sup>23</sup> Outros, entretanto, podem ser benéficos e têm seu uso medicinal muito bem estabelecido. Vários alcaloides são utilizados pelo mercado farmacêutico e devido à sua complexidade, ainda são produzidos através da extração de fontes naturais, como é o caso da escopolamina **(6)** que é utilizada como antiespasmódico, o Paclitaxel® (taxol) **(7)**, vimblastina **(8)** e vincristina **(9)**, poderosas drogas anticâncer.<sup>24,25</sup> A

**Figura 2** mostra a estrutura de algumas destas substâncias.



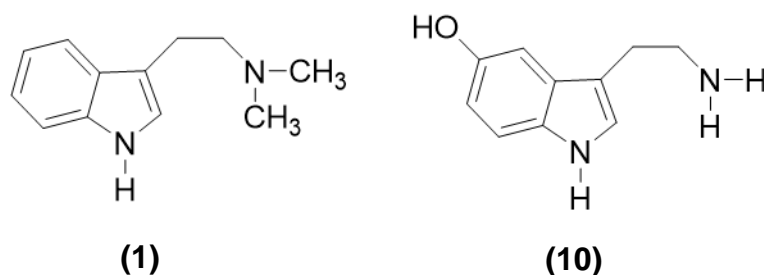
**Figura 2.** Estrutura de alguns alcaloides utilizados na indústria farmacêutica, escopolamina **(6)**, Paclitaxel® (taxol) **(7)**, vimblastina **(8)** e vincristina **(9)**.<sup>26</sup>

Grande parte dos alcaloides apresentam alguma ação fisiológica no sistema nervoso central. Suas propriedades farmacológicas incluem atividades analgésicas, estimulantes ou depressoras do SNC, reguladoras da pressão arterial, antipiréticas, antieméticas, antimaláricas, anticâncer, entre outras.<sup>21</sup>

### 1.2.2 N,N-dimetiltriptamina (DMT) e as beta-carbolinas

A DMT é um alcaloide indólico do grupo das triptaminas que possui propriedades psicoativas. Ocorre naturalmente em várias plantas e também pode ser encontrado no corpo humano em pequenas quantidades no cérebro. Em quantidades controladas, a DMT é essencialmente não tóxica e não causa dependência ou comportamentos aditivos.<sup>27</sup> Apesar dos vastos estudos, seu papel fisiológico ainda não foi determinado. Alguns autores apontam sua atividade como regulatória de inflamações, na regulação homeostática do sistema imunológico ou, ainda, como ansiolítico endógeno, entre outras.<sup>28,29</sup> Sua estrutura é muito semelhante à da serotonina (5-HT) (**10**), por isso, esta substância funciona com um agonista do sistema serotoninérgico ligando-se aos receptores 5-HT.

A DMT isolada ou sintética é uma droga proscrita<sup>30</sup>, considerada droga de abuso e seu uso recreativo é proibido no Brasil, EUA, em toda a Europa e vários outros países. A DMT faz parte da lista de drogas psicotrópicas da *Convention on Psychotropic Substances* de 1971, proposta pelos EUA na Conferência das Nações Unidas daquele ano e adotada por diversos países desde então. Porém, segundo o relatório anual de 2010 do INCB (*International Narcotics Control Board*), apesar de haver controle sobre algumas substâncias isoladas, como é o caso da DMT, nenhuma planta ou preparação natural utilizando plantas (como por exemplo decocções ou chás) estão sob controle internacional, portanto, teoricamente, a ayahuasca não deveria ser/é um produto controlado internacionalmente.<sup>31,32</sup>



**Figura 3.** Estrutura molecular da serotonina (**10**) em comparação com a estrutura do DMT (**1**).

O uso da DMT pode ser feito através de inalação ou por via intravenosa ou oral. Quando inalada, a dose padrão de consumo varia entre 15-60 mg. Neste caso, seus efeitos alucinógenos ocorrem rapidamente, em cerca de 45 segundos, e a

duração leva cerca de 15 minutos.<sup>33</sup> A DMT apresenta efeito similar quando injetada. Porém, por via oral, a DMT não possui ação alucinógena, a não ser quando associada a outras substâncias.

Os efeitos alucinógenos da DMT, no uso por administração intravenosa, começam a ser experimentados pelos usuários a partir de doses equivalentes a 0,2 – 0,4 mg/kg.<sup>34,35</sup> Já doses de DMT acima de 1000 mg foram consideradas seguras para ingestão por via oral, considerando uma pessoa com 70 kg, equivalente a dose de 14 mg/kg.<sup>36</sup>

Como já mencionado, a DMT, quando ingerida por via oral, não apresenta ação alucinógena, isto ocorre pois, assim como outras triptaminas, a DMT é rapidamente inativada pela enzima monoaminoxidase A (MAO-A) presente nos intestinos e fígado.<sup>37</sup> Para que a DMT seja bioativa por via oral, é necessária sua ingestão associada a substâncias que possam inativar temporariamente esta enzima e permitir que a DMT caia na corrente sanguínea. No caso da ayahuasca, as beta-carbolinas assumem este papel. Sendo assim, uma vez que as beta-carbolinas, e possivelmente outros alcaloides presentes em menor quantidade na ayahuasca, também apresentam ação psicoativa, não é possível inferir precisamente qual a real dose ativa do DMT por via oral.<sup>38</sup> Riba *et al.*<sup>2</sup> conduziram testes em voluntários que consumiram ayahuasca encapsulada para avaliação da relação dose/efeito. Nesse estudo, doses com 0,5 mg/kg de DMT já mostraram efeitos alucinógenos nos voluntários.

Estudos feitos na década de 90 sugeriam o uso da farmauasca (*pharmauasca*) e testavam quantidades conhecidas de DMT associadas à harmina, encapsuladas, para serem ingeridas de forma oral. Nestes estudos, as doses efetivas de DMT/HME eram de cerca de 50/100 mg, ou, para indivíduos com peso médio de 75 kg, 0,6 e 2 mg/kg, respectivamente.<sup>39</sup>

Em relação a toxicidade da DMT isolada existem poucos estudos na literatura. Experimentos feitos com ratos mostraram resultados de toxicidade para DMT com LD<sub>50</sub> de 47 mg/kg, na forma intraperitoneal e 32 mg/kg para a aplicação intravenosa. Não foram encontrados relatos da toxicidade por dose oral, porém, substâncias análogas à DMT, como serotonina e 5-MeO-DMT (**11**), apresentaram resultados de LD<sub>50</sub> de respectivamente, 60 mg/kg e 278 mg/kg.<sup>40,41</sup>

Gable<sup>40</sup> (2016), utilizando os dados descritos anteriormente, extrapola os cálculos e sugere que a dose letal, por via intravenosa, deve ser algo em torno de 1,6

mg/kg de DMT, levando em consideração que humanos são 20 vezes mais sensíveis que roedores.

Considerando ainda um fator de conversão de 1:5 entre a atividade da DMT quando ingerida oralmente em relação à aplicação intravenosa, o autor mais uma vez extrapolando os cálculos, sugere que a dose letal oral do DMT seria cerca de 8 mg/kg e sugere a dose segura de consumo no ritual como algo em torno de 20 mg totais de DMT por dose de chá, porém, esta dose estaria abaixo da dose ativa (0,25 mg/kg).

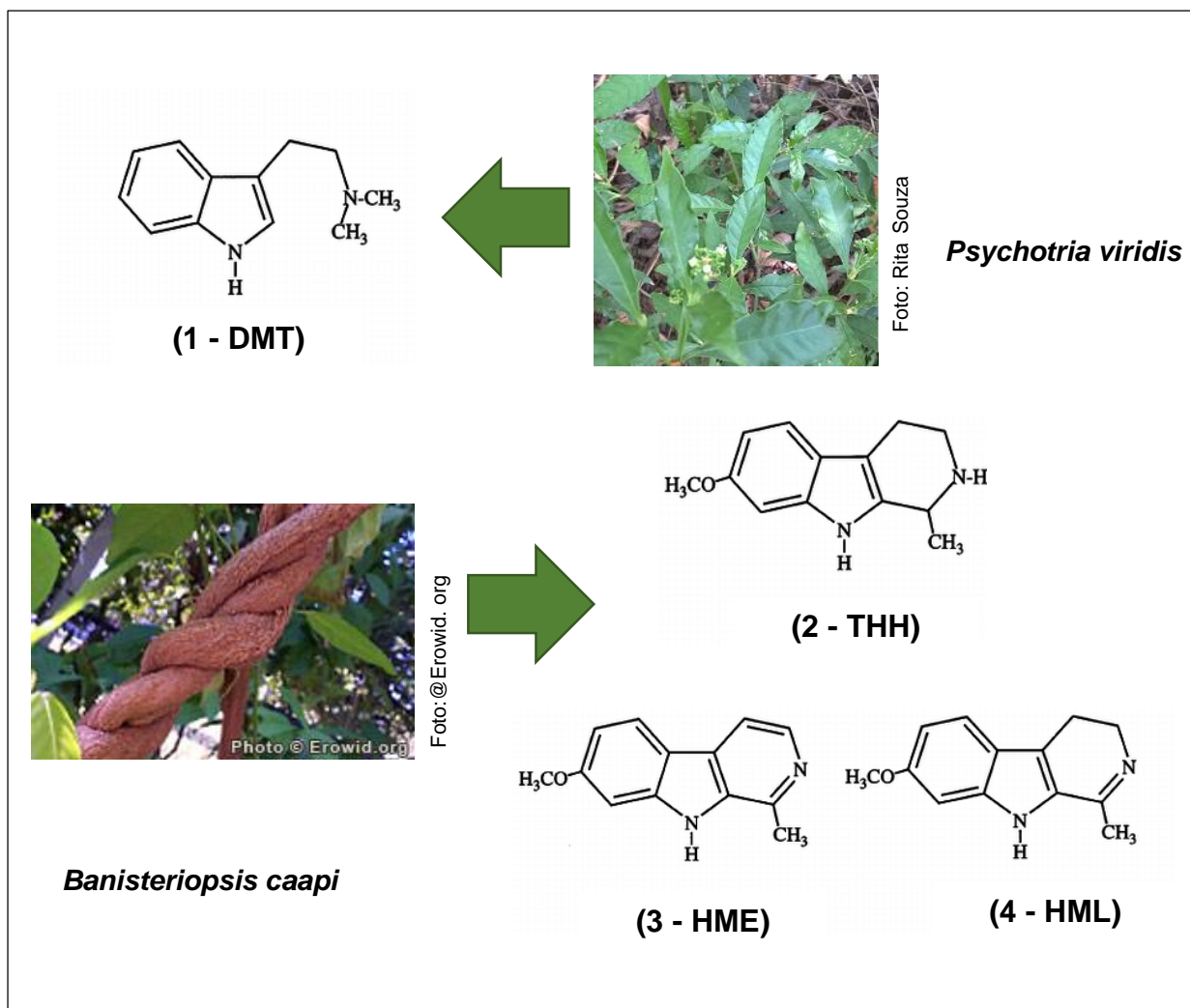
Já as beta-carbolinas são alcaloides que se caracterizam pela presença de um anel indólico, sendo conhecidos como alcaloides de harmala, pois foram isolados pela primeira vez das folhas da *Peganum harmala* L.<sup>42</sup> Estas substâncias são estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e inibidores da monoaminaoxidase (MAOi).

As beta-carbolinas também apresentam efeitos alucinógenos, porém, menos acentuados que aqueles que ocorrem quando da associação com outras substâncias.<sup>42</sup> Quanto à toxicidade, estes alcaloides mostraram-se bem menos tóxicos que a DMT. Um extrato feito com sementes de *P. harmala*, administrado por via oral em ratos levou a uma LD<sub>50</sub> de 2 g/kg.<sup>40</sup>



### 1.3 Efeitos fisiológicos da ayahuasca

O estudo das plantas isoladas mostram que a DMT é proveniente das folhas da *Psychotria viridis*<sup>iii</sup> e as beta-carbolinas são encontradas no cipó da *Banisteriopsis caapi*<sup>iv</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Espécies vegetais mais utilizadas na ayahuasca e seus principais ativos.

Como já mencionado, a união das substâncias, presentes nas duas plantas usadas no preparo da ayahuasca, causa um efeito sinérgico que confere ao chá sua atividade psicotrópica.

Os efeitos físicos que podem ser provocados pela ingestão da ayahuasca são a midríase, aumento da atividade cardíaca e da pressão arterial, elevação do cortisol

<sup>iii</sup> Foto de Rita Souza feita no CPQBA (arquivo pessoal).

<sup>iv</sup> Foto retirada de <https://erowid.org/plants/banisteriopsis/banisteriopsis.shtml>

e prolactina, entre outros.<sup>43</sup> Já os efeitos subjetivos são caracterizados pela alteração dos estados de consciência, o que incluem modificação da percepção do corpo, no âmbito auditivo, visual e tátil e alterações na percepção do tempo/espaço, aumento da afetividade (polarização de emoções), entre outros.<sup>44</sup>

No caso da ayahuasca, os efeitos colaterais fisiológicos mais comuns relatados após o consumo da bebida foram: tremores, tontura, vômitos e diarreia. Porém, no contexto religioso, esses efeitos são considerados normais e esperados e representam uma necessidade de limpeza e purga para os usuários.<sup>44</sup>

#### 1.4 Uso terapêutico da ayahuasca

A possibilidade do uso da ayahuasca como medicamento natural ou fitoterápico no tratamento da depressão ou do alcoolismo, está diretamente ligada à ação de seus ativos no SNC. Não menos importante está o estudo da variação dos ativos nas mais diversas amostras e sua ligação com a eficiência terapêutica da bebida. Uma vez determinada essa faixa de concentração, deve ser possível a produção de um produto padronizado. A padronização de fitomedicamentos ou fitoterápicos é um pré-requisito para a garantia da sua qualidade e segurança, e é a maneira de se garantir a manutenção e eficácia dos seus efeitos terapêuticos.<sup>45</sup>

Existem poucos estudos em relação à toxicidade da ayahuasca, ou de seus ativos, em humanos. A maior parte dos artigos, senão sua totalidade, descreve testes de toxicidade em modelos animais, alguns com posterior extrapolação ao uso por humanos.<sup>46</sup> Entretanto, estudos feitos ao longo dos últimos anos, com usuários frequentes de ayahuasca, sugerem que a bebida, da maneira em que é administrada no contexto ritual, não parece apresentar toxicidade séria. Pelo contrário, vários estudos revelam que os usuários tendem a ter melhorias nas funções cognitivas e psicológicas.<sup>47,48</sup> Somente alguns casos isolados de intoxicação agudas foram descritos, normalmente estão associados ao uso recreativo da bebida, onde a dose não é controlada e muitas vezes é associada à outras substâncias.<sup>49,50</sup>

### 1.5 Métodos de análise aplicados ao estudo da ayahuasca

A técnica escolhida para a determinação dos ativos na ayahuasca foi a UHPLC-MS/MS (*ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*). A metodologia experimental une duas técnicas analíticas que, mesmo separadas, já se mostram eficientes e robustas, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) e a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Estas duas técnicas utilizadas em conjunto consistem em uma estratégia muito importante nas análises quantitativas e qualitativas que conferem ao método analítico maior eficiência, seletividade e rapidez. Muito utilizada para a análise de amostras complexas, esta ferramenta une as vantagens da UHPLC (alta resolução e eficiência de separação) com as da MS/MS (alta seletividade e sensibilidade).<sup>51,52</sup>

Nas análises quantitativas, o uso da espectrometria sequencial torna possível análises com o monitoramento com foco nos analitos de interesse, o que aumenta muito a sensibilidade e seletividade das análises. Já nas análises qualitativas, o uso desta ferramenta pode auxiliar na caracterização e identificação dos compostos presentes nas amostras, principalmente em se tratando de matrizes complexas como são os extratos vegetais.<sup>53</sup>

#### 1.5.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS)

A cromatografia líquida (LC, do inglês, *liquid chromatography*) é uma técnica de separação de substâncias químicas que envolve a adsorção/dissolução dos analitos entre duas fases, uma estacionária (FE), geralmente sólida, e uma fase móvel líquida (FM). Seus conceitos já estão bastante sedimentados e a técnica é reconhecidamente uma das mais utilizadas como ferramenta nas determinações analíticas, tanto quantitativas como qualitativas.<sup>54</sup>

A UHPLC tem como vantagens a possibilidade de análise de substâncias complexas, apresentando grande resolução e eficiência de separação, em tempo reduzido de análise. Fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC (*high performance liquid chromatography*), porém, as principais diferenças estão nas dimensões reduzidas de suas colunas, que apresentam de 5 - 10 cm de comprimento e 1 - 2,1 mm de diâmetro interno. As colunas são recheadas com partículas de FE  $\leq$

2  $\mu\text{m}$  e permitem trabalhar com altas velocidades lineares de FM aumentando, assim, a resolução e detectabilidade<sup>v</sup> dos analitos nas análises<sup>55</sup>, diminuindo o tempo das corridas, porém, gerando um aumento significativo na pressão de trabalho, sendo necessário o uso de sistemas adequados que suportem tais condições.<sup>51</sup>

O acoplamento da UHPLC com a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) já está bem consolidado, sendo que os espectrômetros de massas atuais têm capacidade de trabalhar com parâmetros como: tempo de residência (*dwel time*), tempos de troca de canal (*inter-channel delay*) e tempos de troca de varredura (*inter-scan delay*), para a formação do pico cromatográfico permitindo que a UHPLC possa ser aplicada nas mais diversas áreas.<sup>56</sup>

Os espectrômetros de massas são compostos basicamente por três partes: a fonte de ionização (onde os íons são gerados), os analisadores de massas (filtros de íons de acordo com a relação  $m/z$  dos mesmos) e os detectores (multiplicadores de sinais). Seu acoplamento com a LC revolucionou as análises das misturas complexas e isso só foi possível com o desenvolvimento da ionização por *electrospray* (ESI, do inglês, *electrospray ionization*). O uso da ESI na espectrometria de massas é relativamente recente, seu surgimento e desenvolvimento iniciam-se na década de 80, possibilitando, como foi dito anteriormente, o acoplamento dos espectrômetros de massas aos equipamentos de cromatografia líquida (LC-MS)<sup>57</sup>. Com o desenvolvimento da ESI, em 1984, um novo horizonte se abre para a MS. A ESI permite que não somente substâncias de polaridade moderada, voláteis e termostáveis possam ser separadas e analisadas, mas também, moléculas grandes, altamente polares e pouco voláteis, como fármacos, produtos cosméticos, organometálicos,<sup>58</sup> proteínas<sup>59</sup> e até vírus.<sup>60</sup> O desenvolvimento da ESI está ligado à viabilização da transferência, para a fase gasosa, destas substâncias de baixíssima ou nenhuma volatilidade.

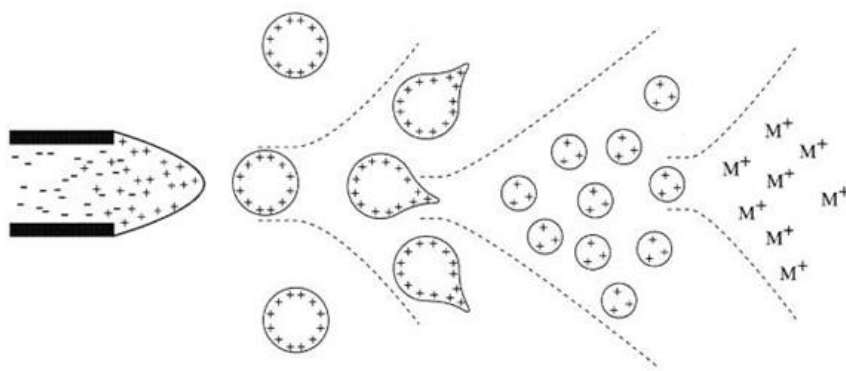
Na ESI, geralmente as moléculas são ionizadas já em solução durante o preparo da amostra e a ionização ocorre por meio de protonação ou quelação com cátions, para o modo positivo, ou da desprotonação, no caso do modo negativo. Assim

---

<sup>v</sup> **Detectabilidade:** A detectabilidade está relacionada ao estreitamento do pico, que propicia um aumento significativo na sua detecção uma vez que os analitos ao eluírem como picos mais estreitos e intensos são mais facilmente detectados. A relação sinal/ruído é aumentada.

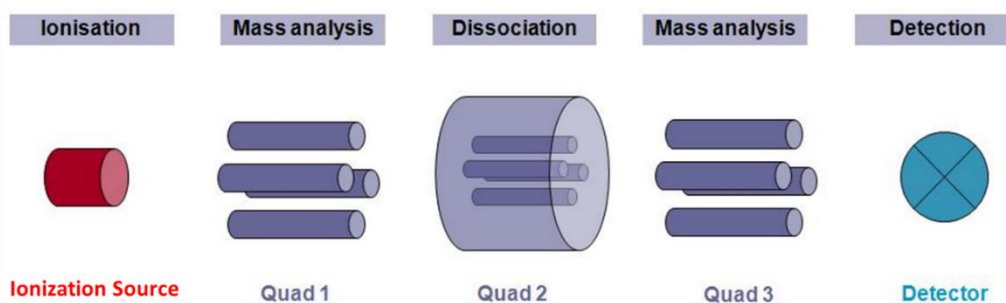
a amostra é inserida na fonte de ionização ou dessorção, seja por meio de infusão direta ou de um cromatógrafo.<sup>61</sup>

Na fonte de ionização por ESI (**Figura 5**) ocorrem as seguintes etapas (1) nebulização da amostra através de um capilar muito estreito onde é aplicado um potencial da ordem de kV, formando assim um spray com gotículas carregadas, (2) secagem do solvente através de um jato de N<sub>2</sub> gasoso aquecido, (3) ejeção dos íons para fase gasosa. Esse processo promove a dessorção do analito carregado e sua liberação para a fase gasosa. Os íons em fase gasosa são atraídos para o analisador de massas e são, então, separados de acordo com sua relação massa-carga ( $m/z$ ).<sup>61</sup>



**Figura 5.** Mecanismo de ionização/dessorção por *electrospray*.<sup>61</sup>

Outra ferramenta que potencializou o uso dos espectrômetros de massas nas determinações analíticas qualitativas e quantitativas foi a possibilidade de se colocar espectrômetros em série, a chamada espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Um dos analisadores sequenciais mais utilizados é o do tipo triplo-quadrupolo (**Figura 6**). Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo funciona como uma cela de colisão, onde pode ocorrer a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo. Esta fragmentação geralmente se dá por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês, *collision-induced dissociation*) com o uso de um gás inerte. O segundo quadrupolo, quando não está sendo utilizado para promover as fragmentações funciona como focalizador e direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.



**Figura 6.** Esquema de um analisador triplo quadrupolo.<sup>62</sup>

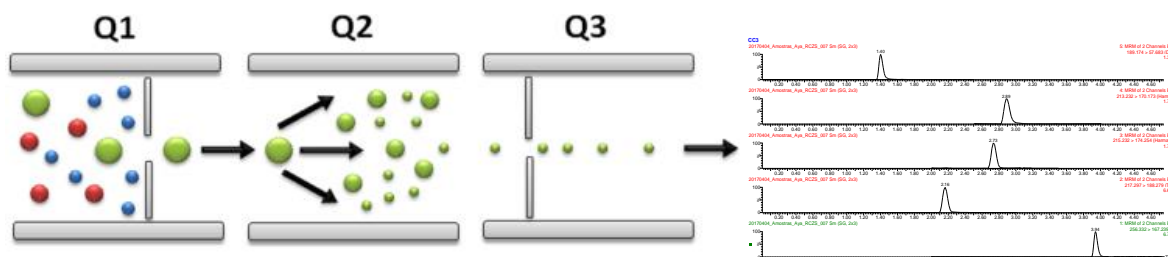
O uso de espectrômetros sequenciais ou em série torna possível a aplicação de várias estratégias de análise, dependendo dos objetivos, o que permite desde o monitoramento de íons específicos selecionados, como pode fornecer alguma informação estrutural das substâncias presentes em amostras complexas. Isso é feito a partir da seleção do íon de interesse e de sua fragmentação em uma cela de colisão e posterior análise dos fragmentos.<sup>61</sup> Estas estratégias são chamadas de técnicas de varredura. Como exemplos podemos citar a varredura dos íons produto (*product-ion scan*), varredura dos íons precursores (*precursor-ion scan*), varredura de perda neutra (*neutral loss scan*) e o monitoramento de reações selecionadas (SRM - *selected reaction monitoring*),<sup>63</sup> sendo esta última a estratégia escolhida para realizar esse trabalho e será melhor explicada no próximo item.

#### 1.5.2 Monitoramento de reações selecionadas (SRM)

O SRM é uma das estratégias usadas em espectrometria de massas sequencial que se caracteriza por ser altamente seletiva e sensível, por esse motivo, é muito utilizada em análises quantitativas em amostras complexas, como extratos vegetais,<sup>64</sup> alimentos<sup>65</sup> e fluidos biológicos.<sup>66</sup>

Um esquema de uma análise por SRM usando um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo é mostrado na **Figura 7**. No primeiro quadrupolo (Q1), os íons do analito de interesse são selecionados (íon precursor), o segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma câmara de colisão onde, devido à dissociação induzida por colisão (CID) dos íons promovida pelo argônio em alta energia, fragmentos são gerados com relações  $m/z$  específicas do analito (íons produto). No terceiro quadrupolo (Q3), os íons produto são, então, separados e encaminhados ao detector.

Um ou mais íons gerados podem ser selecionados como marcadores para quantificação, formando pares, chamados de transições, e somente os compostos que apresentem ambos os íons na transição serão detectados, conferindo grande seletividade à técnica. Além do mais, uma vez que o quadrupolo ignora outros íons, sendo usado somente para seleção dos íons de interesse e suas transições, temos que a sensibilidade da análise também é bastante aumentada.<sup>67,68</sup>



**Figura 7.** Esquema de uma análise por SRM.<sup>68</sup>

Como dito anteriormente, o que possibilita aos espectrômetros de massas uma ótima performance no acoplamento com a UHPLC são parâmetros como:

**Tempo de residência (*dwel time*):** tempo de duração no qual cada sinal de  $m/z$  é coletado. Pode-se variar esse parâmetro de modo a se detectar picos com mais pontos ou aumentar a sensibilidade da técnica; neste caso, pode haver diminuição do número de pontos. A escolha deve ser feita de acordo com o tipo e objetivo da análise.<sup>69</sup>

**Tempos de troca de canal (*inter-channel delay*):** é o tempo requerido entre uma transição (ou canal) de SRM e outra, importante para que haja a limpeza de íons da cela de colisão impedindo falsos positivos.<sup>70</sup>

**Tempos de troca de varredura (*inter-scan delay*):** é o tempo requerido entre uma varredura de  $m/z$  e outra.

O uso simultâneo de técnicas de separação de alta performance associadas a estratégias de quantificação altamente seletivas, como a SRM, fazem da UHPLC-MS/MS uma ferramenta dificilmente superada por outras técnicas, quando se diz respeito a determinações de múltiplas substâncias de interesse em matrizes complexas.

## 1.6 Fingerprinting e Quimiometria

O *fingerprinting* é uma estratégia que se caracteriza por análises rápidas e versáteis, utilizando pouco preparo e baixa quantidade de amostra, e que resulta em informações sobre a composição química geral de uma determinada amostra. É uma importante ferramenta, muito utilizada para avaliação da qualidade e perfil das mais variadas matrizes. Aliada à espectrometria de massas, torna-se muito eficiente para a caracterização e avaliação de produtos naturais.<sup>71,72</sup>

Um *fingerprint* pode ser definido como um conjunto de dados multivariados adquiridos por técnicas espectroscópicas ou espectrométricas (MS, IR, UV, NMR, entre outras) de análise direta ou acopladas a técnicas de separação prévias (como cromatografia e eletroforese) para amostras complexas e que reflitam os analitos ou grupo de analitos de interesse detectáveis nas amostras analisadas. No caso dos extratos vegetais estes analitos são, geralmente, metabólitos secundários.

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos utilizados no planejamento, otimização de procedimentos ou na obtenção de informações químicas através da análise de dados.<sup>73</sup> Estas ferramentas são capazes de converter grandes conjuntos de dados multivariados em uma informação útil e podem ser aplicadas no tratamento dos dados a fim de se obter: o reconhecimento de padrões, a classificação dos dados ou uma calibração multivariada.<sup>74</sup>

Dados de *fingerprinting* normalmente são complexos e contêm muitas informações com natureza multivariada. Sendo assim, a quimiometria é uma importante ferramenta para tratamento destes dados e para uma maior compreensão das informações obtidas.

A análise de componentes principais (PCA), um método não supervisionado de reconhecimento de padrões, é frequentemente a primeira ferramenta quimiométrica utilizada para uma análise exploratória dos dados. O objetivo da PCA é encontrar um modelo mais representativo e geralmente mais compacto de um conjunto original de dados, o que permite extrair desse conjunto de dados informações relevantes para o seu entendimento.

Após a análise exploratória, métodos de classificação podem ser utilizados para a obtenção de modelos. Dentre os métodos de classificação, a PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis* (análise discriminante por mínimos



quadrados parciais) é utilizada para maximizar a separação entre grupos de observações e identificar quais variáveis respondem por essa separação.<sup>75</sup>

A PLS-DA modela a relação entre duas matrizes, o conjunto de dados obtidos através de medições e a matriz da classe de afiliação. O algoritmo decompõe as matrizes usando um determinado número de variáveis latentes tal que uma máxima separação de classes seja obtida. Este método é uma generalização da regressão múltipla linear e é capaz de analisar mais ruídos e dados incompletos.<sup>76</sup>

### 1.7 Validação do método analítico

Existem requisitos mínimos que devem ser atendidos por um procedimento analítico para que este seja considerado confiável e eficiente. Ao conjunto de ensaios que comprovam o atendimento desses requisitos de controle de qualidade do método dá-se o nome de validação.

Para que se possa confiar nos resultados apresentados por um método analítico, seja ele qual for, é necessária a avaliação suas variáveis, que são chamadas de parâmetros de desempenho ou figuras de mérito analítico.<sup>77</sup> O objetivo principal da validação é demonstrar que um determinado método analítico é adequado ao propósito a que foi desenvolvido e que é confiável quanto aos resultados produzidos para uma determinada aplicação.<sup>78</sup> Vários trabalhos na literatura relatam a validação de métodos e definem seus critérios baseados na sua aplicabilidade. Existem diversas normas e regulamentações para os parâmetros de avaliação, principalmente nas áreas farmacêutica, química e bioquímica, que auxiliam na determinação dos critérios a serem utilizados. Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com cada área específica.<sup>79,80</sup>

No caso dos métodos cromatográficos bioanalíticos e, mais especificamente, na quantificação de ativos químicos, as principais referências são ANVISA<sup>81</sup> e INMETRO<sup>78</sup> e os parâmetros normalmente avaliados para esse tipo de análise são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, robustez, além dos limites de detecção e quantificação.

O importante é que a escolha dos parâmetros de validação deve levar em consideração a aplicação do método e as características da amostra e da análise. Na **Tabela 1** é apresentado um resumo dos principais parâmetros a serem validados de acordo com algumas características da análise.

**Tabela 1.** Principais parâmetros a serem validados de acordo com as características da análise<sup>78,81</sup>

	ANVISA		INMETRO		
Parâmetro	Categoria				
	I	II	Qualitativo	Teor	Traços
Especificidade ou seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Repetibilidade/Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Exatidão	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	Não	Sim
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não	Sim
I - Testes quantitativos para determinação do <b>princípio ativo</b> em produtos farmacêuticos ou matérias-primas					
II - Idem a I para <b>impurezas e produtos de degradação</b>					
<b>Teor</b> (concentrações entre 0,01 a 1%) e <b>traços</b> (abaixo de 0,01%)					

O Guia da ANVISA (2003) tem sido uma das referências para validação dos métodos cromatográficos mais utilizadas no Brasil nos últimos anos, tanto no meio acadêmico quanto no meio industrial. Em julho de 2017, a ANVISA publicou uma revisão da resolução de 2003, que passa a vigorar desde então.<sup>82</sup> Esta nova resolução estabelece critérios para a validação de métodos analíticos e revoga a resolução anterior, para fins de avaliação de processos de registro na ANVISA. Porém, no que tange o escopo deste trabalho, não houve alterações significativas na norma que justifique uma revisão na validação já realizada com base na referência anterior.

Em relação aos parâmetros já estabelecidos na RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) anterior da ANVISA, a nova RDC detalha como devem ser demonstrados, além de prever o efeito matriz para matrizes complexas. Segundo a ANVISA, a resolução dará agilidade ao processo de registro pois detalha os critérios a serem avaliados. Esta nova resolução aplica-se a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, porém exclui métodos microbiológicos.<sup>83</sup>

## 2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento, validação e aplicação de um método analítico para quantificar os princípios ativos presentes na bebida ayahuasca. A presença dos ativos e o perfil químico das amostras (*fingerprinting*) foram também avaliados em algumas amostras alvo por meio da espectrometria de massas, realizando-se análises por LC-MS e LC-MS/MS.

### 2.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de um método analítico eficiente para quantificação simultânea dos compostos ativos da ayahuasca por UHPLC-MS/MS;
- Quantificação dos compostos ativos da ayahuasca em amostras provenientes do estado de São Paulo;
- Quantificação dos compostos ativos da ayahuasca em amostras provenientes da Europa;
- Quantificação dos compostos ativos da ayahuasca em amostras coletadas durante os preparos realizados nos centros da UDV para avaliação da cinética de extração;
- Avaliação do perfil químico (*fingerprinting*) das amostras de ayahuasca utilizando LC-MS e LC-MS/MS.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1 Amostras de ayahuasca analisadas

O material analisado neste trabalho foi o decoto (vulgarmente chamado de chá) das plantas. As amostras de ayahuasca já estavam preparadas e são aquelas utilizadas para consumo. As amostras são provenientes de preparos anteriores armazenados nos centros da UDV ou coletadas durante o acompanhamento de rituais pela pesquisadora Helle Kaasik – Universidade de Tartu, Estônia.

### 3.1.1 Amostras do Estado de São Paulo

As amostras de ayahuasca analisadas foram fornecidas por diferentes centros da UDV e são provenientes de várias partes do Estado de São Paulo. A **Tabela 2** apresenta os códigos das amostras e suas respectivas procedências.

Estas amostras foram provenientes de preparos anteriores armazenados nos centros da UDV. Na sua maioria, foram coletadas por um integrante autorizado a manipular o chá. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo Falcon, de 15 mL, fornecidos pelo nosso grupo de pesquisa e entregues a cada centro pelo Prof. Dr. Luís Fernando Milanez, membro da UDV há vários anos.

Os frascos que recebiam as amostras eram completamente preenchidos para evitar o acúmulo de ar na superfície e evitar uma possível degradação oxidativa.

Todas as amostras, imediatamente após o recebimento, foram aliquotadas em tubos tipo Eppendorf, em volume de 1 mL, identificadas e levadas a congelamento em biofreezer - 80 °C até o momento da análise.

**Tabela 2.** Amostras de ayahuasca do Estado de São Paulo

<b>Código</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Data coleta</b>	<b>Local</b>
CAST_270516_1	Castanheiras	13/07/2016	Arujá
CAST_270516_2	Castanheiras	13/07/2016	Arujá
CAST_270516_3	Castanheiras	13/07/2016	Arujá
NDM_201116_T	Divino Manto	04/03/2017	Itapecerica da Serra
NDM_201116_TC	Divino Manto	04/03/2017	Itapecerica da Serra
NEE_210516_1	Estrela Encantadora	02/07/2016	Piracicaba
NEE_210516_2	Estrela Encantadora	02/07/2016	Piracicaba
NEE_210516_3	Estrela Encantadora	02/07/2016	Piracicaba
NGV_030916_1	Grande Ventura	18/03/2017	Jarinu
NGV_030916_2	Grande Ventura	18/03/2017	Jarinu
Lupu_180616_1	Lupunamanta	02/07/2016	Campinas
Lupu_180616_2	Lupunamanta	02/07/2016	Campinas
Lupu_180616_3	Lupunamanta	02/07/2016	Campinas
NAC_111115_3	Alto das Cordilheiras	16/07/2016	Campinas
NAC_122015_1	Alto das Cordilheiras	16/07/2016	Campinas
NAC_160916_1	Alto das Cordilheiras	17/09/2016	Campinas
NAC_170916_1	Alto das Cordilheiras	17/09/2016	Campinas
NAC_170916_5	Alto das Cordilheiras	17/09/2016	Campinas
NAC_250316_2	Alto das Cordilheiras	16/07/2016	Campinas
NMG_280616_1	Menino Galante	28/06/2016	Mairiporã
NMG_280616_2	Menino Galante	28/06/2016	Mairiporã
NMG_280616_3	Menino Galante	28/06/2016	Mairiporã
NRA_062016_1	Rainha das Águas	24/07/2016	Pocinhos do Rio Verde
NRA_062016_3	Rainha das Águas	24/07/2016	Pocinhos do Rio Verde
NRA_082015_2	Rainha das Águas	24/07/2016	Pocinhos do Rio Verde
NRD_160616_1	Rei Davi	16/06/2016	Mogi das Cruzes
NRD_160616_2	Rei Davi	16/06/2016	Mogi das Cruzes
NPE_160416_2	Princesa Encantada	12/08/2016	Campinas
NPE_270915_1	Princesa Encantada	12/08/2016	Campinas
NRD_150616_TC	Rei Davi	16/06/2016	Mogi das Cruzes
NRD_180916_T	Rei Davi	20/09/2016	Mogi das Cruzes
NRD_180916_TC	Rei Davi	20/09/2016	Mogi das Cruzes
SAMA_170616	Samaúna	24/07/2016	Araçariguama
SAMA_180616	Samaúna	24/07/2016	Araçariguama
SAMA_240716	Samaúna	24/07/2016	Araçariguama
SJB_020716_1	São João Batista	02/07/2016	Mairiporã
SJB_020716_2	São João Batista	02/07/2016	Mairiporã
SJB_020716_3	São João Batista	02/07/2016	Mairiporã

### 3.1.2 Amostras da Europa<sup>vi</sup>

As amostras do grupo da Europa nos foram fornecidas pela pesquisadora Helle Kaasik, teóloga que estuda atualmente os aspectos psicológicos dos usuários de ayahuasca e outras bebidas alucinógenas na Estônia.<sup>84</sup> Estas amostras foram coletadas durante o desenvolvimento do seu projeto de pesquisa, dentre as amostras, várias são identificadas como “Santo Daime”, outras estão identificadas como xamânico<sup>vii</sup>, neoxamânico<sup>viii</sup>, guiado<sup>ix</sup> e psiconáutico<sup>x</sup>. Essas terminologias se referem a outras comunidades, xamânicas ou não, que também utilizam a ayahuasca em seus rituais, sejam eles religiosos, ritos de cura ou de passagem ou apenas para experimentação dos efeitos alteradores da consciência da bebida. A maioria das amostras (exceto EST1-3) avaliadas quanto à sua atividade psicotrópica pela pesquisadora Kaasik, e foram consideradas ativas. Na **Tabela 3** estão descritos os códigos e origem das amostras que foram coletadas na Europa, EUA e Brasil e que serão denominadas de grupo da Europa em referência à localidade de coleta da maioria das amostras deste grupo.

---

<sup>vi</sup> Amostras foram nomeadas como “Amostras da Europa”, pois em sua maioria foram coletadas na Estônia, Finlândia, Itália e Grécia, porém uma parte dessas amostras foram coletadas no Brasil, porém, são provenientes do grupo ayahuasqueiro conhecido como Santo Daime.

<sup>vii</sup> *xamânico*: ritual xamânico tradicional com a presença de um sacerdote (xamã). Algumas tribos amazônicas como Huni Kuin, Yawanawa or Shipibo.

<sup>viii</sup> *neoxamânico*: ritual com elementos dos rituais xamânicos porém sem a presença de um xamã.

<sup>ix</sup> *guiado*: cerimonia guiada com a presença de um facilitador, não necessariamente um xamã; existem regras próprias, diferentes das dos rituais tradicionais.

<sup>x</sup> *psiconáutico* – não têm ritual definido, pessoas se reúnem para experimentar efeitos da ayahuasca em ambiente considerado seguro.

**Tabela 3.** Amostras de ayahuasca do grupo da Europa\*

Amostras	Tipo	Data da coleta	País da coleta
EST_01	mix xamânico + neoxamânico	02/2015	Estônia
EST_02	neoxamânico	02/2015	Estônia
EST_03	neoxamânico	02/2015	Estônia
EST_04	Santo Daime	02/2015	Estônia
EST_05	guiado (neoxamânico)	04/2015	Estônia
EST_06	guiado (neoxamânico)	04/2015	Estônia
EST_07	neoxamânico	06/2015	Estônia
EST_08	Santo Daime	09/2015	Itália
EST_09	guiado (neoxamânico)	11/2015	Estônia
EST_10	guiado (neoxamânico)	11/2016	Estônia
EST_11	guiado (neoxamânico)	11/2016	Estônia
EST_12	xamânico	11/2016	Estônia
EST_13	neoxamânico	05/2016	Estônia
EST_14	Santo Daime	07/2017	Estônia
EST_15	guiado (neoxamânico)	05/2017	Finlândia
EST_16	Santo Daime	03/2017	Brasil
EST_17	neoxamânico	01/2017	Estônia
EST_18	Santo Daime	01/2017	Finlândia
EST_19	neoxamânico	08/2016	Estônia
EST_20	xamânico	10/2016	Brasil
EST_21	Santo Daime	09/2016	Estônia
EST_22	Santo Daime	07/2017	Estônia
EST_23	psiconáutico	10/2015	Estônia
EST_24	neoxamânico	08/2015	Estônia
EST_25	guiado (neoxamânico)	05/2017	Finlândia
EST_26	Santo Daime	07/2016	Grécia
EST_27	Santo Daime	08/2016	Finlândia
EST_28	guiado (neoxamânico)	05/2017	Estônia
EST_29	Santo Daime	04/2017	EUA
EST_30	Santo Daime	06/2017	Finlândia
EST_31	xamânico	07/2017	Brasil
EST_32	neoxamânico	07/2017	Brasil
EST_33	Santo Daime	07/2017	Brasil
EST_34	Santo Daime	07/2017	Brasil
EST_35	Santo Daime	07/2017	Brasil
EST_36	Santo Daime	07/2017	Brasil
EST_37	psiconáutico	07/2017	Brasil
EST_38	neoxamânico	07/2017	Brasil
EST_39	neoxamânico	07/2017	Brasil
EST_39B	neoxamânico	07/2017	Brasil

\*Nove das amostras foram coletadas no Brasil, uma nos EUA, uma na Itália, duas na Finlândia e uma na Grécia e o restante na Estônia.

### 3.1.3 Amostras para avaliação da cinética de extração da ayahuasca

Nosso grupo de pesquisa acompanhou dois preparos da ayahuasca no Centro Beneficente União do Vegetal, Núcleo Alto das Cordilheiras (NAC), localizado na cidade de Campinas-SP, nos dias 17/09/2016 e 02/09/2017.

Para o preparo do chá (ou mais exatamente do decoto), nos centros da UDV, há inicialmente a coleta, seguida do corte e lavagem dos cipós. Logo em seguida ocorre a trituração, seja através do processo chamado na UDV de “bateção” ou através da moagem em moinhos. As folhas da *P. viridis*, após a colheita, são separadas, lavadas e secas com tecido de algodão. O mariri (*Banisteriopsis caapi*) (**Figura 8-A**) foi coletado em Barão Geraldo, no bairro Guará. Já a chacrona (*Psychotria viridis*) (**Figura 8-B**) foi coletada na propriedade onde se encontra a sede do Núcleo Alto das Cordilheiras.



**Figura 8.** Cipó mariri (A) e folhas de chacrona (B) utilizadas em preparo da ayahuasca.

Na decocção ou preparo são utilizadas de 4 a 6 panelas, de aproximadamente 200 litros cada, e uma fornalha. Inicia-se o preenchimento das panelas com uma camada de cipó após triturado e depois uma camada de folhas e assim sucessivamente até enchê-las (**Figura 9**). Em seguida, são colocadas na fornalha e completadas com água, iniciando-se, assim, a decocção que tem duração de cerca de 2 horas (**Figura 10**).



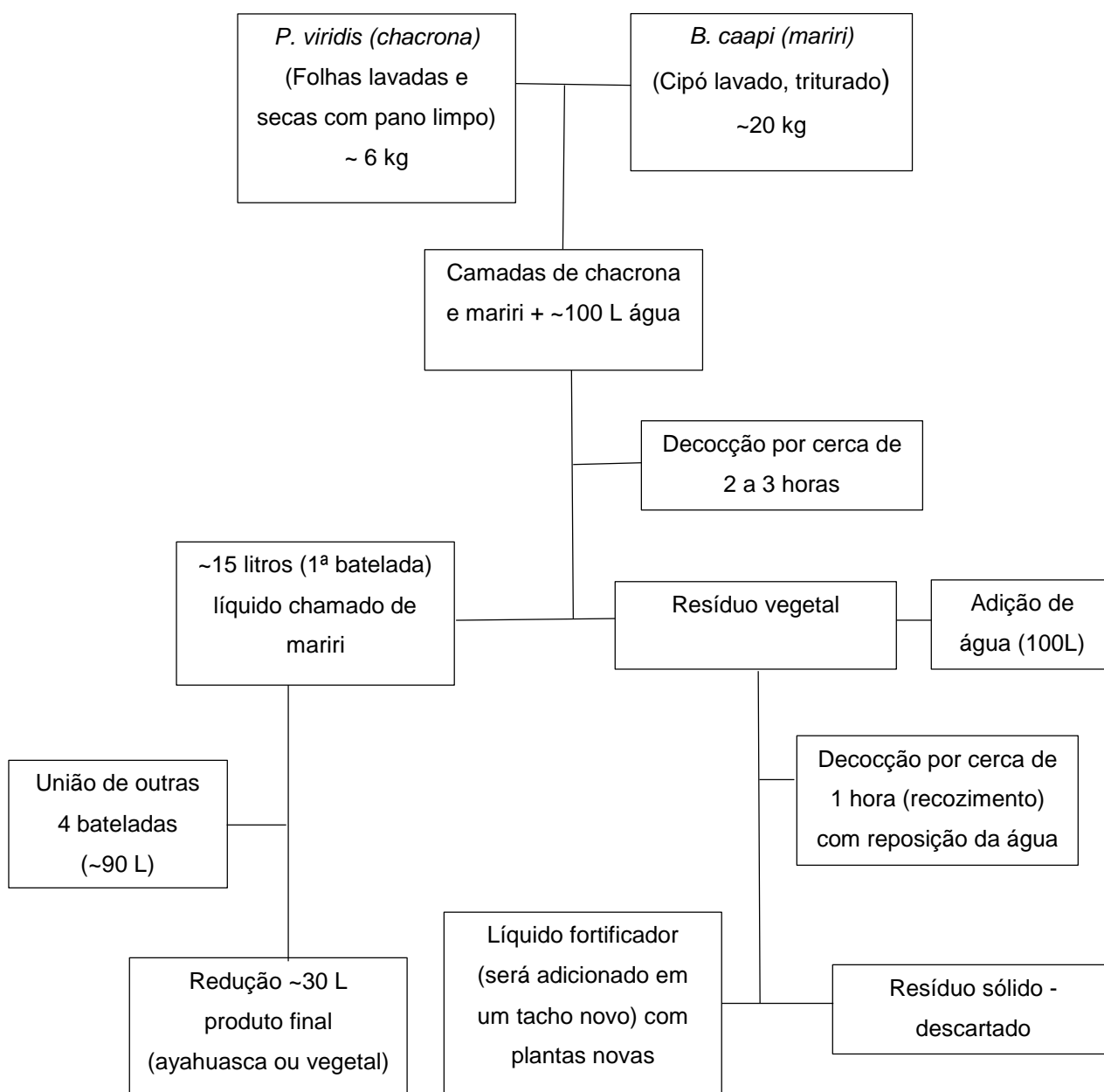


**Figura 9.** Preparo do tacho para decocção.



**Figura 10.** Tachos na fornalha.

As amostras do preparo foram coletadas durante o processo de decocção, acompanhando-se, desde o início da fervura e na sequência a cada 20 minutos até se completar o ciclo de redução do decoto (chamado de “mariri”) e ao final da produção da ayahuasca (junção das bateladas). O fluxograma abaixo (**Figura 11**), ilustra os passos do preparo da ayahuasca.



**Figura 11.** Fluxograma do preparo da ayahuasca.

### 3.2 Procedimento Experimental

#### 3.2.1 Materiais e reagentes

Foram utilizados padrões analíticos dos ativos: dimetiltryptamina 95% Cayman Chemical, harmina 98%, harmalina 95%, tetraidroharmina 95% e o padrão interno cloridrato de difenidramina 98% da marca Sigma-Aldrich.

Para o preparo das amostras, padrões e fases móveis (FM) foram utilizados metanol (grau cromatográfico – Tedia), água desionizada e com resistividade de 18,2 mohm cm (Milli-Q – Millipore), e ácido fórmico (p.a. – JT Baker, 88%).

#### 3.2.2 Equipamentos e instrumentação

As análises foram realizadas por UHPLC-MS/MS usando um cromatógrafo Waters Acquity equipado com um sistema de bombeamento de solventes binário, um sistema de injeção de amostras automático acoplado a um espectrômetro de massas em série Micromass Quattro Micro™ API, triplo quadrupolo, com interface ESI (ESI™ multi mode ionization) (Waters Corp., Milford, MA, EUA). A aquisição e tratamento dos dados foram realizados utilizando-se o software MassLynx v. 4.1. O sistema foi equipado com uma coluna cromatográfica analítica Acquity™ UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm de diâmetro de partícula) (Waters Corp., Milford, MA, EUA).

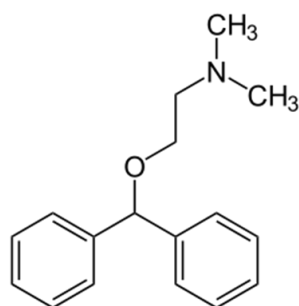
Para o preparo das amostras, padrões e fase móvel foram utilizados ainda os seguintes equipamentos: centrífuga (Hettich®, modelo MIKRO 220R), agitador vórtex (Dragon Lab MX-S), balança analítica, com precisão de 5 casas decimais (Sartorius, modelo CP225D), banho ultrassom (Unique, modelo USC-2800), micropipeta de 10 – 100 µL (Gilson®, modelo PIPETMAN® G - P100G), micropipeta de 100 - 1000 µL (Gilson®, modelo PIPETMAN® G - P1000G).

### 3.2.3 Preparo da curva analítica

As análises foram realizadas utilizando padronização interna. O padrão interno (PI) escolhido foi o cloridrato de difenidramina **(11)**. A escolha do cloridrato de difenidramina como padrão interno levou em consideração sua facilidade de aquisição e custo relativamente reduzido frente aos padrões marcados isotopicamente. Além disso, esta substância apresenta as características de um PI ideal, isto é, está ausente nas amostras, disponível em alta pureza, não interage com os analitos e não interfere nas suas determinações. A curva analítica foi preparada a partir de sete soluções estoque (uma para cada ponto da curva) contendo os quatro analitos e com as concentrações descritas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Concentração das soluções padrão estoque

	<b>DMT (mg/L)</b>	<b>THH (mg/L)</b>	<b>HME (mg/L)</b>	<b>HML (mg/L)</b>
1	7,50	17,5	30,0	5,00
2	18,0	42,0	60,0	7,50
3	30,0	70,0	100	10,0
4	42,0	98,0	150	13,5
5	52,5	123	200	17,5
6	63,0	147	250	22,5
7	75,0	175	300	27,5



**(11)**

**Figura 12.** Estrutura molecular do cloridrato de difenidramina **(11)** usado como PI.

Para cada ponto da curva analítica seguiu-se o procedimento de preparo descrito a seguir, para um volume final de 250 µL. Em um tubo tipo Eppendorf de 600 µL, adicionaram-se 150 µL do solvente metanol:água (1:1 v/v), adicionaram-se 50 µL

da solução estoque corresponde ao ponto da curva; adicionaram-se então 50 µL de uma solução de 10 mg/L do PI, na solução final. A mistura foi agitada por aproximadamente 30 segundos em agitador tipo vórtex e transferida para *vial* com *insert* de 250 µL. Foi injetado 1 µL em um equipamento de UHPLC-MS/MS. Na **Tabela 5** estão descritas as concentrações para cada analito nos pontos das curvas.

**Tabela 5.** Concentração dos pontos das curvas analíticas

Ponto	DMT (mg/L)	THH (mg/L)	HME (mg/L)	HML (mg/L)
1	1,50	3,50	6,00	1,0
2	3,60	8,40	12,0	1,5
3	6,00	14,0	20,0	2,0
4	8,40	19,6	30,0	2,7
5	10,5	24,5	40,0	3,5
6	12,6	29,4	50,0	4,5
7	15,0	35,0	60,0	5,5

#### 3.2.4 Preparo das amostras para injeção

Antes do preparo, todas as amostras foram retiradas do biofreezer e deixadas em temperatura ambiente até descongelamento total. Após equilibradas a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10000 rpm e a 25 °C. Essas condições mostraram-se suficientes para que todo o material particulado, conhecido como borra, fosse separado do sobrenadante, o qual utilizamos para preparo das diluições. Após esse procedimento, as amostras foram diluídas utilizando-se como solvente uma mistura de metanol e água 1:1 (v/v) e um volume equivalente a 2 mg/L do padrão interno (PI).

### 3.3 Condições instrumentais para determinação quantitativa dos ativos

#### 3.3.1 Otimização das condições cromatográficas

A separação cromatográfica dos ativos estudados foi otimizada avaliando-se as condições tanto em no modo de eluição isocrático, como no modo de eluição por gradiente, utilizando-se diferentes composições de fase móvel (FM).

Foram testados como eluente composições de acetonitrila:água e metanol:água, com uso de ácido fórmico 0,1% (v/v). Foram testadas ainda várias

vazões da FM (0,2 até 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). As condições finais, que mostraram melhor resultado com compromisso de melhor resolução entre os picos com menor tempo de análise está representada na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Condições utilizadas para a etapa cromatográfica na quantificação dos ativos da ayahuasca

Parâmetro	Descrição		
Coluna	(BEH) C18 (50 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ )		
Fase móvel A	Água + 0,1% (v/v) ácido fórmico		
Fase móvel B	Metanol + 0,1% (v/v) ácido fórmico		
Volume de injeção	1,0 $\mu\text{L}$		
Vazão	0,350 mL/min		
Tempo de corrida	6,50 min		
Temperatura da amostra	10,0 $^{\circ}\text{C}$		
Temperatura da coluna	40,0 $^{\circ}\text{C}$		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	Inicial	90	10
	4,0	50	50
	5,0	50	50
	5,5	50	50
	6,0	90	10

### 3.3.2 Otimização das condições espectrométricas

A otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas foi realizada utilizando-se os padrões a fim de se determinar as melhores condições na fonte de dessorção (fonte de íons) e no analisador de massas para que houvesse ganho de sinal analítico com a maior seletividade possível.

As condições da fonte foram determinadas avaliando-se os sinais dos analitos quando da variação de parâmetros como: voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação, entre outros. A melhor condição de fonte encontrada para a análise em questão está representada na **Tabela 7**.

Já para a otimização dos parâmetros do analisador de massa do tipo QqQ, e da análise por SRM, foi feita a avaliação das melhores voltagens e energias de colisão para cada transição de massas de cada analito. Na **Tabela 8** estão representadas as condições otimizadas do SRM para a determinação dos ativos na ayahuasca.

**Tabela 7.** Condições instrumentais para análise por espectrometria de massas

Parâmetro	Descrição
Modo de ionização	ESI(+)
Voltagem capilar (kV)	3,00
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura do gás de dessolvatação	400 °C
Vazão do gás de dessolvatação	100 L/h
Vazão do gás no cone	600 L/h

**Tabela 8.** Condições SRM para cada analito

Analito	Transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
<i>N,N</i> -Dimetiltriptamina (DMT)	189 > 57 (1)	15	10
	189 > 144 (2)	15	10
Tetraidroharmina (THH)	217 > 188 (1)	15	15
	217 > 200 (2)	15	10
Harmina (HME)	213 > 170 (2)	35	25
	213 > 198 (1)	35	20
Harmalina (HML)	215 > 174 (1)	35	20
	215 > 200 (2)	35	20
Cloridrato de difenilidramina (PI)	256 > 152	15	35

(1) Transição de quantificação e (2) transição de confirmação.

### 3.4 Condições instrumentais para análise qualitativa das amostras (LC-MS baixa resolução)

Nas análises de LC-MS das amostras da Estônia visando a busca de contaminantes, a separação cromatográfica foi otimizada com intuito de se obter melhor separação entre os picos, para isso optou-se pela mudança do gradiente em relação à análise de UHPLC-MS/MS, aumentando também o tempo de análise.

Foram testados como eluente composições de metanol:água, com uso de ácido fórmico 0,1% (v/v). A vazão foi mantida em 0,35 µL/min. As condições finais, que mostraram melhor resultado de resolução entre os picos com menor tempo de análise, estão representadas na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Condições utilizadas para a etapa cromatográfica nas análises de LC-MS

Parâmetro	Descrição		
Coluna	(BEH) C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm)		
Fase móvel A	Água + 0,1% (v/v) ácido fórmico		
Fase móvel B	Metanol + 0,1% (v/v) ácido fórmico		
Volume de injeção	1,0 µL		
Vazão	0,350 mL/min		
Tempo de corrida	11 min		
Temperatura da amostra	10,0 °C		
Temperatura da coluna	40,0 °C		
Gradiente	<b>Tempo (min)</b>	<b>% Fase móvel A</b>	<b>% Fase móvel B</b>
	Inicial	90	10
	10,0	10	90
	11,0	90	10

### 3.5 Condições instrumentais para análise qualitativa das amostras (HRMS)

Foram realizadas análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*) nas amostras da Estônia a fim de se obter informações sobre possíveis contaminantes tanto sintéticos como naturais.

Os equipamentos utilizados foram: Agilent 1290 UHPLC acoplado ao Agilent 6500 QTOF e o instrumento Waters Xevo QTOF (Manchester, UK), de geometria híbrida quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) e equipado com fonte de ionização do tipo nanoESI. As condições utilizadas na fonte de ionização estão descritas a seguir.

As amostras foram dissolvidas em concentração apropriada em solução de H<sub>2</sub>O/MeOH 50:50 (v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, e injetadas por infusão direta via uma bomba de seringa, a uma vazão de 15 a 20 µL/min. Para aquisição dos espectros foram utilizados os seguintes parâmetros instrumentais: voltagem do capilar de 0,1 a 3 kV, voltagem do cone de 10-30 V, temperatura da fonte 100 °C, energia de colisão 6-50 eV, frequência de aquisição 1 Hz. Antes de cada análise o instrumento foi calibrado com íons de oligômeros de ácido fosfórico (solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,005% v/v em H<sub>2</sub>O/MeCN 50:50 v/v), de *m/z* 90 a 1000.



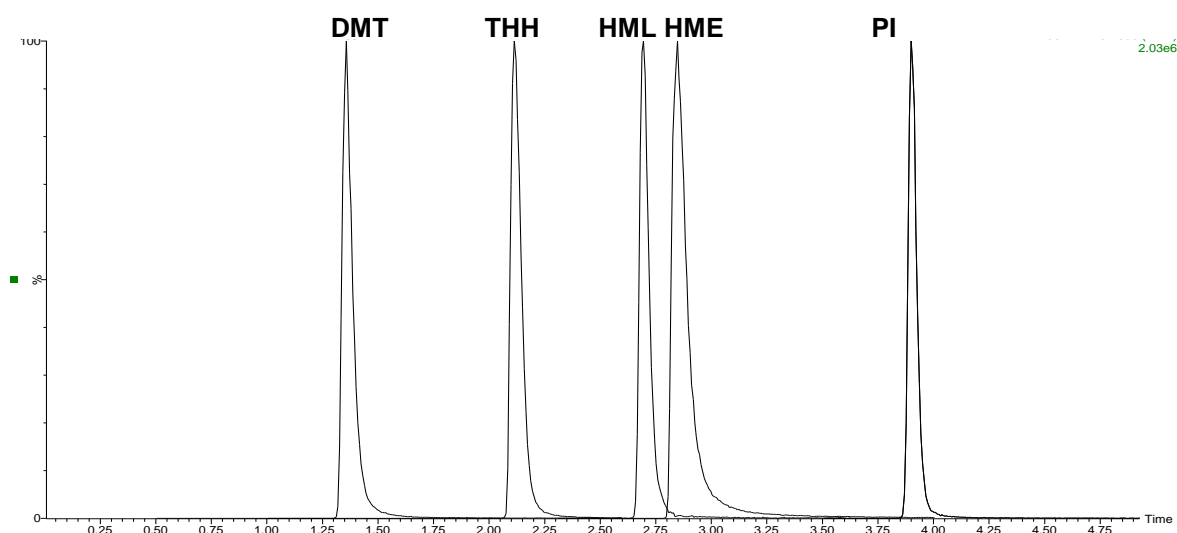
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização das condições de análise

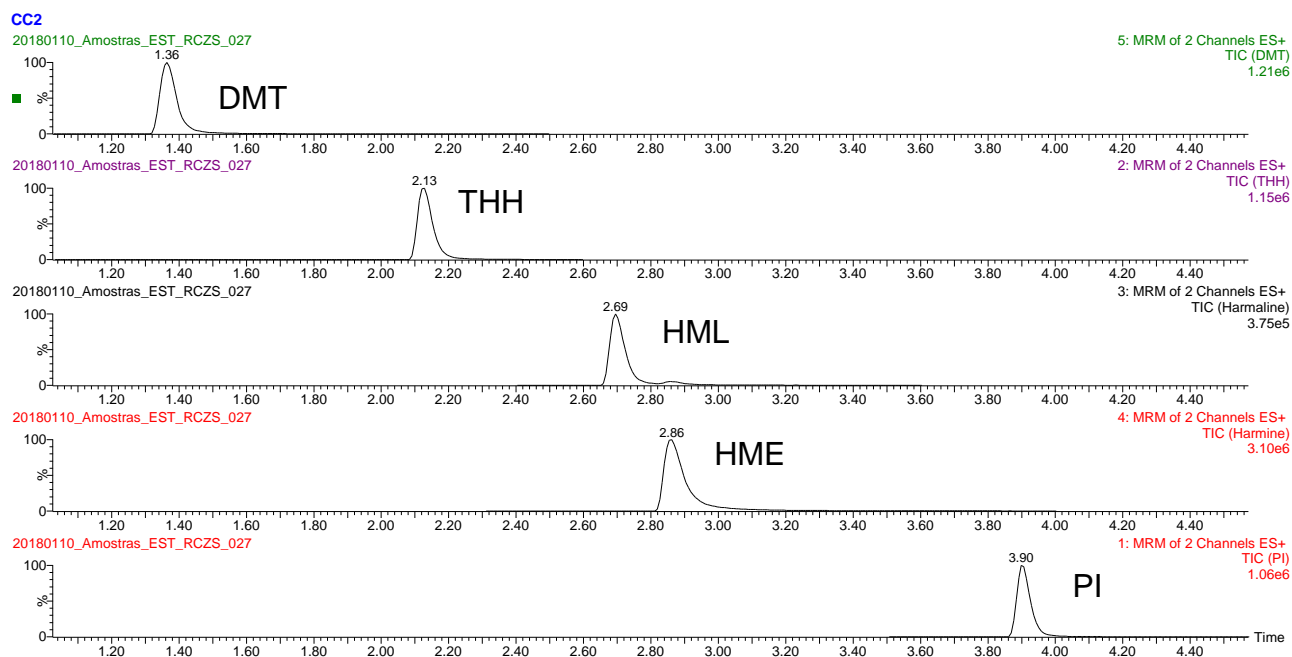
#### 4.1.1 Separação cromatográfica dos ativos

Por meio dos vários testes realizados com diferentes condições cromatográficas foi possível obter uma condição em que os ativos e o padrão interno (PI) estivessem separados, com boa resolução entre os picos e no menor tempo de análise possível. Estas condições estão descritas no item 3.3.1. Na

**Figura 13** encontra-se a representação do cromatograma de separação dos ativos e na **Figura 14** a separação por canais de transição.



**Figura 13.** Cromatograma obtido na separação dos ativos da ayahuasca empregando-se UHPLC-MS/MS. Condições cromatográficas: volume de injeção 1  $\mu$ L; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm  $\times$  2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 4 min - 50:50 v/v; 5,5 min - 50:50 v/v; 6 min - 90:10 v/v.



**Figura 14.** Cromatogramas obtidos na separação dos ativos da ayahuasca empregando-se UHPLC-MS/MS. Condições cromatográficas: volume de injeção 1  $\mu$ L; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm  $\times$  2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 4 min - 50:50 v/v; 5,5 min - 50:50 v/v; 6 min - 90:10 v/v. As condições de MS/MS estão descritas no item 3.3.2.

## 4.2 Validação do método

### 4.2.1 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico de obter respostas analíticas que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração.<sup>82</sup> Já a faixa linear é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração onde é possível a determinação do analito de interesse com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio.<sup>78</sup>

A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (área do pico cromatográfico) e a massa ou concentração da substância a ser quantificada. Esta correlação pode ser expressa, matematicamente, através da equação da reta da denominada curva analítica. O cálculo estimado dos coeficientes de uma curva a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuado usando o método

matemático conhecido como regressão linear e a equação que descreve a curva analítica pode ser expressa pela **Equação I**.<sup>78</sup>

$$y = ax + b \text{ (Equação I)}$$

onde:

**y** é a resposta medida pelo detector (absorbância, área do pico, etc.);

**x** é a concentração nominal do analito;

**a** é o coeficiente angular (inclinação da curva);

**b** é o coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y).

Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, através do modelo de regressão, também é possível avaliar a associação linear entre as variáveis por meio do cálculo coeficientes de correlação (**r**) e de determinação (**r<sup>2</sup>**), que são medidas descritivas da qualidade do ajuste do modelo. Estes parâmetros permitem avaliar a qualidade da curva obtida e, quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes estimados.

A linearidade pode ser obtida por meio de vários métodos de construção das curvas analíticas, descritos a seguir.<sup>79</sup>

**Padronização Externa:** comparação da área do analito na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão.

**Padronização Interna:** feita a partir no preparo de soluções padrão de concentrações conhecidas do analito, com a adição de uma a mesma quantidade conhecida de um padrão interno.

**Adição de Padrão:** é realizada adicionando-se quantidades conhecidas do analito à mesma quantidade conhecida da amostra, antes de seu preparo. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada.

**Superposição de matriz:** consiste no preparo de uma curva através da adição do padrão do analito em diversas concentrações, em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância. Esse método pode ser utilizado para calibração, tanto

com a padronização interna como com a padronização externa e é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes.

A superposição de matriz é de grande importância em determinações quando a matriz pode interferir na análise. Sua principal vantagem sobre a padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra, porém, nem sempre é possível ou financeiramente viável a obtenção da matriz isenta do analito.

Para o cálculo da linearidade foram preparadas três curvas analíticas, com sete pontos cada, variando-se a concentração dos analitos de acordo com os intervalos descritos no item 3.1.3 (**Tabela 5**). A partir das curvas analíticas construídas para os quatro analitos, foram obtidas as equações de reta e os coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $R^2$ ) e a faixa dos valores obtidos para os resíduos estatísticos que se encontram descritos na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Dados de linearidade para os quatro analitos estudados

Linearidade (n=21)	Analito (faixa de trabalho)			
	DMT (1,5 – 15,0 mg/L)	THH (3,5 – 35,0 mg/L)	HME (6,0 – 60,0 mg/L)	HML (1,0 – 5,5 mg/L)
<b>r</b>	0,9956	0,9982	0,9966	0,9969
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9912	0,9963	0,9933	0,9939
<b>Equação da reta</b>	$y=0,2644x+0,4749$	$y=0,0925x+0,1756$	$y=0,1798x+1,282$	$y=0,1608x+0,0766$
<b>Resíduos (faixa)</b>	-0,16 a 0,23	-0,07 a 0,18	-0,33 a 0,50	-0,029 a 0,032

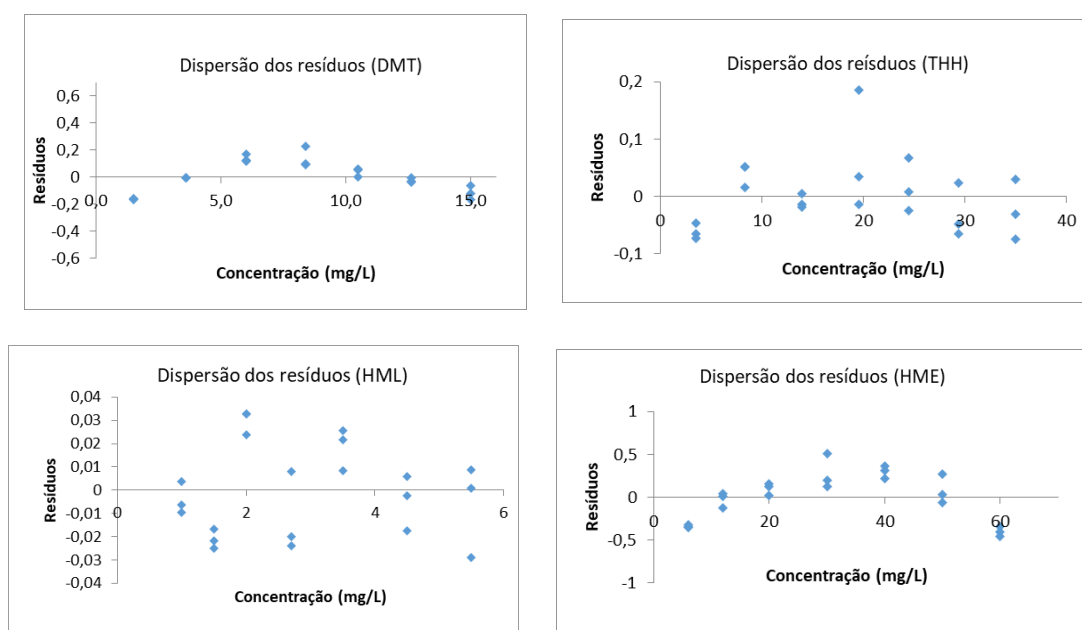
As curvas obtidas para os quatro analitos apresentaram linearidade mínima de 0,990. Os dados de regressão linear foram obtidos pelo *software* do equipamento (MassLynx, Waters) e também por cálculo em Excel para confirmação dos resultados. A ANVISA<sup>81</sup> recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 e o INMETRO,<sup>78</sup> valores acima de 0,90.

Por meio dos gráficos dos resíduos, foram confirmadas as baixas dispersões dos resultados para os analitos em estudo. Verificou-se ainda que os mesmos não apresentaram tendência significativa, observadas pela construção dos gráficos de dispersão de resíduos, confirmando a linearidade das curvas, como pode ser verificado na **Figura 15**.

Os dados da análise de variâncias (ANOVA) (**Figura 16**) mostram também os valores de p-valor (F de significação) abaixo do nível de significância estabelecido de 0,05 (5%), confirmando assim que existe pelo menos uma diferença significativa entre dois grupos.

Já a significância da regressão, determinada pelo teste F, propõe que quando  $F \geq p\text{-valor}$ , deve existir relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta de regressão não é nula. Assim, há indicação de que a regressão é significativa. Entretanto, se  $F \leq p\text{-valor}$ , não há indicação de existência de relação linear entre as variáveis x e y e não tem sentido utilizar a regressão.<sup>85</sup> Os dados da ANOVA mostram os valores de F sempre maiores que o p-valor para todas as curvas.<sup>86</sup>

Desta maneira, conclui-se que as curvas obtidas para os quatro alcaloides estudados possuem linearidade adequada nas faixas de trabalho determinadas e foram utilizadas para as análises neste trabalho.



**Figura 15.** Gráficos de dispersão de resíduos para os analitos estudados.

ANOVA					
DMT					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	1	29,74	29,74	2150,76	5,14E-21
Resíduo	19	0,26	0,01		
THH					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	1	19,84	19,84	5143,62	1,35E-24
Resíduo	19	0,073	0,004		
HME					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	1	231,80	231,80	2817,05	4,03E-22
Resíduo	19	1,56	0,082		
HML					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	1	1,2	1,25	3074,33	1,77E-22
Resíduo	19	0,008	0,0004		

**Figura 16.** Dados da análise de variâncias (ANOVA) para os analitos estudados.

#### 4.2.2 Seletividade e efeito matriz

A seletividade é capacidade do método analítico de identificar ou quantificar o analitos de interesse, inequivocamente, mesmo na presença de interferentes, como impurezas, diluentes e componentes da matriz.<sup>82</sup> Pode ser descrita ainda como a capacidade de distinguir a resposta de um analito das dos outros.<sup>78</sup>

A seletividade de um método analítico pode ser avaliada de duas formas, seja, comparando-se uma matriz isenta dos analitos com a matriz adicionada com os padrões e verificar a existência de coeluição destes compostos junto a interferentes da matriz, ou utilizando-se detectores modernos e seletivos, como é o caso do espectrômetro de massas em série, que permite selecionar as transições SRM entre os pares de íons analitos e seus íons fragmentos específicos.<sup>79</sup>

A intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra. Alguns autores acreditam que o efeito dos coextratos sobre a resposta da do analito deveria ser avaliado pela comparação do método de superposição de matriz com a padronização externa (padrões preparados nos solventes). A interferência da matriz pode ser determinada, então, sobrepondo-se as curvas obtidas pela padronização interna ou externa com e sem

superposição da matriz. A obtenção de retas paralelas indica que a matriz não interfere no sinal do analito, mas se as retas se cruzarem, a matriz está interferindo nas determinações e torna-se necessário realizar a quantificação usando o método da superposição da matriz.<sup>79</sup>

Matrizes complexas, como são os extratos vegetais, por exemplo, não apresentam padrões comerciais de matrizes isentas de analito; nesse caso, existem outras formas de se avaliar o efeito da matriz nas análises.

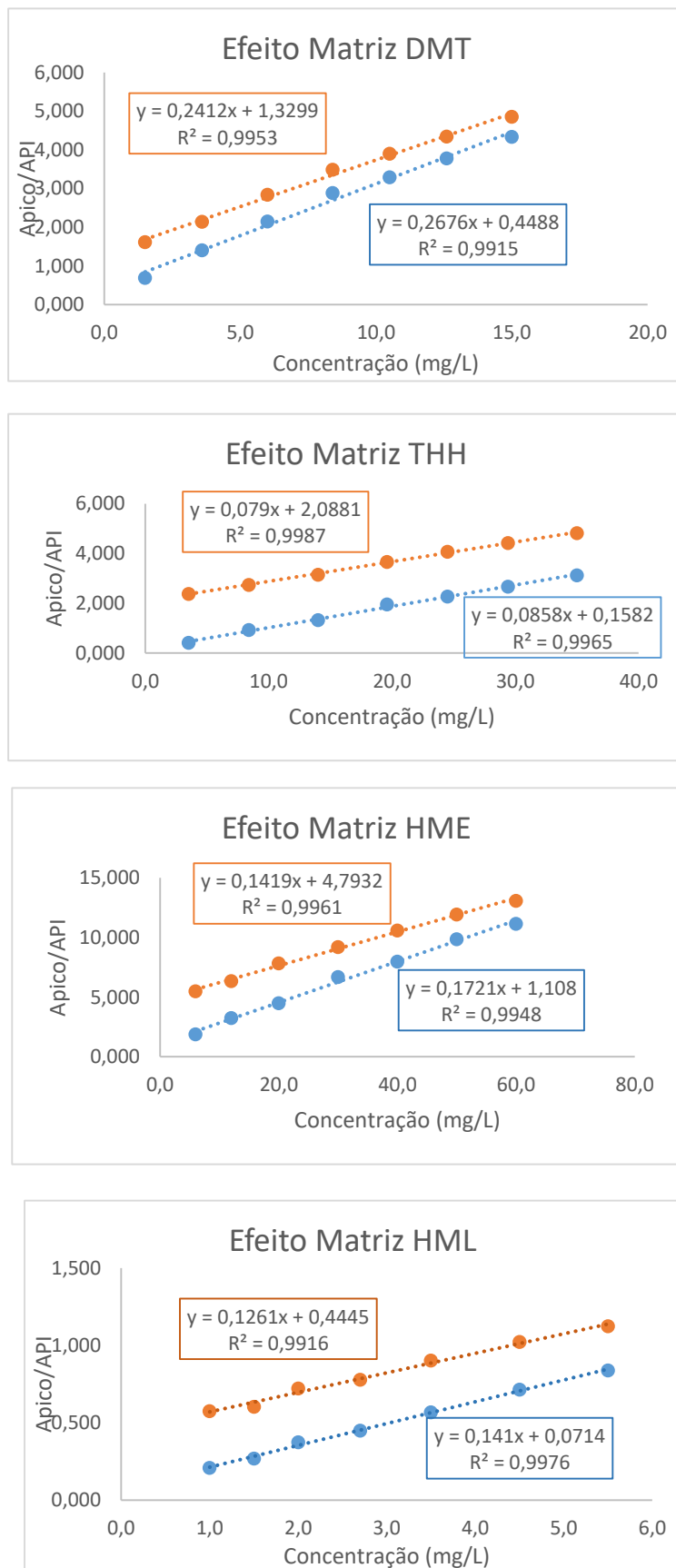
Em amostras nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância de interesse deve-se utilizar o método de adição de padrão.<sup>78</sup>

No caso da ayahuasca, e de muitas matrizes naturais, não é possível conseguir uma amostra livre dos analitos. Assim, a garantia da seletividade na análise está na escolha do método mais adequado.

A espectrometria de massas, e mais especificamente a estratégia SRM, por ser extremamente seletiva, mostra-se ideal para estes casos. Ao se utilizar o modo SRM, temos a presença do sinal analítico somente quando os pares de transições de massas estão presentes, nas condições específicas, confirmando, assim, a medida dos compostos de interesse mesmo em presença de possíveis interferentes.

De qualquer forma, é importante avaliar como estas substâncias podem interferir na medida, seja afetando a intensidade do sinal, devido à supressão iônica na fonte de ionização, seja na alteração dos tempos de retenção, por alargamento de pico ou mesmo seu deslocamento.

Neste sentido, para avaliar o efeito da matriz na performance do método, utilizamos um *pool* de amostras escolhidas entre aquelas com menores concentrações dos analitos, para minimizar o efeito de interferências. Assim, comparou-se a linearidade de uma curva analítica preparada usando-se o *pool* como matriz com a curva preparada no solvente. Na **Figura 17** são apresentadas as curvas de calibração resultantes para os quatro analitos de interesse.



**Figura 17.** Representação das curvas de regressão linear para o teste de efeito matriz.



O comportamento paralelo entre as linhas de regressão indica que um método possui seletividade ou, neste caso, quanto mais paralelas as curvas, menor é o efeito da matriz para a análise. No caso dos analitos estudados para a matriz do chá, pudemos observar que o efeito da matriz é menos acentuado para DMT e THH e um pouco mais para HME e HML.

Andrade<sup>87</sup> sugeriu que o efeito matriz fosse avaliado pela relação entre os coeficientes angulares das duas curvas geradas sendo que, quanto mais próximo de 1, menor seria o efeito da matriz na análise. Recentemente, o guia mais atual publicado pela ANVISA<sup>82</sup>, também indica o uso da comparação das razões dos coeficientes angulares das curvas preparadas no solvente e na matriz ou na amostra para avaliação do efeito matriz.

Os valores encontrados ficaram entre 0,93-0,82 (**Tabela 11**). O ideal para esta análise seria o uso do método de superposição de matriz, que consiste na construção da curva analítica na matriz isenta dos analitos. Como isso não é possível, outra opção seria o método de adição de padrão, porém, para a quantidade de amostras analisadas neste trabalho, esta opção tornou-se inviável na prática e optou-se pela padronização interna. De qualquer forma, considerada a complexidade da análise, o efeito da matriz não se mostrou significativo a ponto de prejudicar a qualidade dos resultados obtidos.

**Tabela 11.** Razão entre os coeficientes angulares das curvas (avaliação do efeito matriz)

<b>Efeito matriz (curvas)</b>			
	<b>Coeficiente angular</b>		<b>Razão</b>
<b>DMT</b>	0,2412	0,2676	0,90
<b>THH</b>	0,0790	0,0858	0,93
<b>HML</b>	0,1261	0,1410	0,89
<b>HME</b>	0,1419	0,1721	0,82

#### 4.2.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra preparada seguindo as condições do método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade (também chamada de precisão intra-corrida), da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.

***Repetibilidade (precisão intra-corrida):*** concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).<sup>79,81</sup>

***Precisão intermediária (precisão inter-corridas):*** é a medida da concordância entre os resultados adquiridos em um mesmo laboratório, obtidos com analistas diferentes em dias diferentes, e/ou equipamentos diferentes. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.<sup>79,81</sup>

***Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial):*** concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, com alteração de analista e equipamentos, como em estudos colaborativos. São exigidos quando há necessidade da padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias.<sup>79,81</sup>

##### 4.2.3.1 Repetibilidade (precisão intra-corridas)

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada.

Este ensaio busca avaliar a concordância entre os resultados em um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade foi feita a partir da avaliação da análise de 3 concentrações de soluções chamadas controle de qualidade (CQ), respectivamente, com concentração baixa, média e alta (CQB, CQM, CQA), compreendidas no intervalo linear, em triplicata, na mesma corrida, conforme recomendação da ANVISA. Neste trabalho, utilizou-se

como valores de CQB o segundo ponto de cada curva, CQM o ponto central e como CQA o penúltimo ponto da curva, para cada analito, como demonstrado na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Valores das soluções de controle de qualidade (CQ) utilizados na validação

	DMT (mg/L)	THH (mg/L)	HME (mg/L)	HML (mg/L)
<b>CQB</b>	3,6	8,4	12	1,5
<b>CQM</b>	8,4	19,6	30	2,7
<b>CQA</b>	12,6	29,4	50	4,5

#### 4.2.3.2 Precisão intermediária (precisão intercorridas)

Neste caso, utilizou-se o mesmo protocolo avaliando-se os resultados em dias diferentes e com analistas diferentes. A precisão é expressa como o desvio padrão relativo (DP) ou coeficiente de variação (CV %) entre as medidas. O limite para os valores é de 15%.<sup>81</sup> A **Tabela 13** mostra os valores para o método em avaliação.

**Tabela 13.** Dados de precisão para os quatro analitos estudados

	Repetibilidade (CV %)			Ensaio de precisão intermediária (CV %)								
	Ensaio 1			Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
<b>Analito</b>	<b>DP (%)</b>											
<b>DMT</b>	1,5	1,9	1,9	1,5	1,9	1,9	2,8	0,7	2,8	1,5	1,1	1,6
<b>THH</b>	1,3	1,1	2,1	1,3	1,1	2,1	0,0	1,0	2,8	0,6	1,1	0,3
<b>HME</b>	2,0	3,5	0,7	2,0	3,5	0,7	2,1	1,4	1,1	4,2	1,2	0,9
<b>HML</b>	4,0	0,0	1,3	4,0	0,0	1,3	2,8	0,7	2,8	0,0	2,0	1,2

#### 4.2.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor de referência considerado verdadeiro. Algumas estratégias podem ser utilizadas para avaliar a exatidão de um método analítico, são elas: aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), uso de materiais de referência certificados; comparação entre diferentes métodos de análise; ensaios de recuperação; adição de padrão.<sup>79</sup>

Os mesmos ensaios usados para o cálculo da precisão foram utilizados para o cálculo da exatidão, neste caso, são reportados os valores de porcentagem de erro (**Tabela 14**) em relação aos valores teóricos de concentração.

**Tabela 14.** Dados de exatidão para os quatro analitos estudados

	<b>Intra-corrida (erro relativo%)</b>			<b>Intercorridas (erro relativo%)</b>								
	<b>Ensaio 1</b>			<b>Ensaio 1</b>			<b>Ensaio 2</b>			<b>Ensaio 3</b>		
<b>Analito</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
<b>DMT</b>	3,6	5,6	2,7	3,6	5,6	2,7	0,0	4,9	0,8	4,4	9,7	1,6
<b>THH</b>	7,4	5,0	0,6	7,4	5,0	0,6	5,6	1,5	0,1	10	9,5	6,7
<b>HME</b>	3,5	2,5	1,0	3,5	2,5	1,0	1,9	1,7	1,4	1,9	7,2	3,9
<b>HML</b>	4,7	0,0	3,1	4,7	0,0	3,1	0,0	4,9	0,8	0,0	4,7	8,8

#### 4.2.5 Robustez

Um método analítico é considerado robusto quando mostra sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso rotineiro. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A robustez de um método cromatográfico é verificada, pela variação de um dos parâmetros de análise por vez, como por exemplo, pH e força iônica da fase móvel

em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc.

Neste estudo, foram utilizadas a variação na vazão da fase móvel de 0,350 mL/min para 0,300 mL/min (**Tabela 15**) e na temperatura da coluna, de 40 °C para 35 °C (**Tabela 16**).

**Tabela 15.** Dados de robustez para os quatro analitos estudados (vazão da fase móvel)

	Robustez: vazão da fase móvel (recuperação %)											
	DMT			THH			HME			HME		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Replicata 1	100	108	99,2	108	105	101	99,2	105	100	100	100	100
Replicata 2	100	108	100	106	107	101	95,8	109	101	93,3	96,3	100
Replicata 3	97,2	110	94,4	108	105	98,0	98,3	102	97,0	93,3	100	95,6
Média	99,1	109	97,9	108	105	100	97,8	106	99,5	95,6	98,8	98,5
s	1,6	0,70	3,0	1,4	1,1	1,9	1,7	3,3	2,2	3,8	2,1	2,6
RSD	1,6	0,60	3,1	1,3	1,0	1,9	1,8	3,2	2,2	4,0	2,2	2,6
Erro	0,90	8,7	2,1	7,5	5,4	0,1	2,2	5,6	0,50	4,4	1,2	1,5

**Tabela 16.** Dados de robustez para os quatro analitos estudados (temperatura da coluna)

	Robustez: temperatura (recuperação %)											
	DMT			THH			HME			HME		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Replicata 1	97,2	106	97,6	106	105	100	99,2	88,3	97,0	93,3	92,6	100
Replicata 2	97,2	106	96,8	102	105	100	95,8	86,7	91,7	86,7	96,3	100
Replicata 3	100	106	92,9	102	104	97,6	98,3	87,5	95,3	86,7	96,3	95,6
Média	98,1	106	95,8	104	105	99,3	97,8	87,5	94,7	88,9	95,1	98,5
s	1,6	0,0	2,6	2,1	0,90	1,5	1,7	0,80	2,7	3,8	2,1	2,6
RSD	1,6	0,0	2,7	2,0	0,80	1,5	1,8	1,0	2,9	4,3	2,2	2,6
Erro	1,9	6,0	4,2	3,6	4,6	0,70	2,2	12	5,3	11	4,9	1,5

### 4.3 Quantificação dos ativos

Todas as amostras foram analisadas em triplicata de preparo e quantificadas com o uso do aplicativo TargetLynx™ do *software* MassLynx™. Com o TargetLynx™ foram verificados os cromatogramas de cada análise e obteve-se a resposta com base na razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno para cada análise. Foram construídas as curvas analíticas com o programa Excel e foram calculadas as concentrações de cada analito nas amostras.

#### 4.3.1 Amostras de São Paulo

A **Tabela 1** dos anexos mostra os resultados obtidos para quantificação dos quatro ativos em amostras de ayahuasca provenientes do estado de São Paulo. São apresentados os resultados da média de três análises da mesma amostra, em triplicata de preparo para cada amostra, com apresentação do desvio padrão (**DP**) e do coeficiente de variação percentual (**CV**). Observa-se pela **Tabela 1** dos anexos que existe uma grande variação nas concentrações dos ativos nas amostras. Estes mesmos dados estão representados em um gráfico (**Figura 18**) com as concentrações dos ativos nas diferentes amostras analisadas.

Pela figura fica mais fácil observar a heterogeneidade das amostras de ayahuasca, porém, no geral, a não ser pelas amostras vindas do núcleo Grande Ventura (GV), que apresentaram concentração de THH acima da média, os ativos apresentam a mesma ordem de grandeza de concentração entre as amostras do grupo.

Tanto a referência da ANVISA quanto a do INMETRO sugerem que, em casos de análises de altos teores do analito, pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e quantificação (LoD e LoQ). Para fins deste trabalho, utilizou-se como LoQ para cada analito o ponto de concentração mínima de cada curva. Valores encontrados abaixo deste limite foram descritos com  $< \text{LoQ}$ .

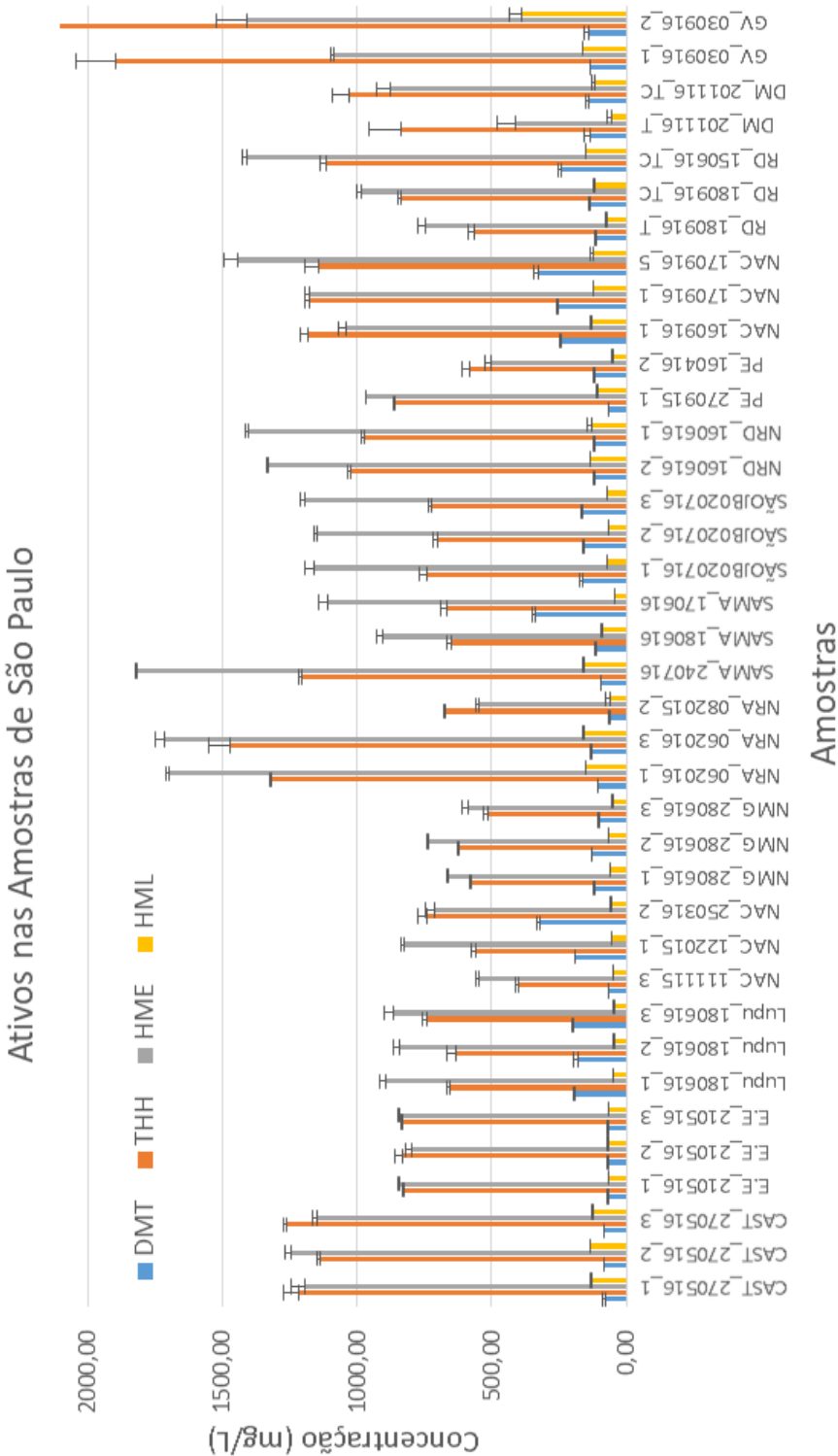
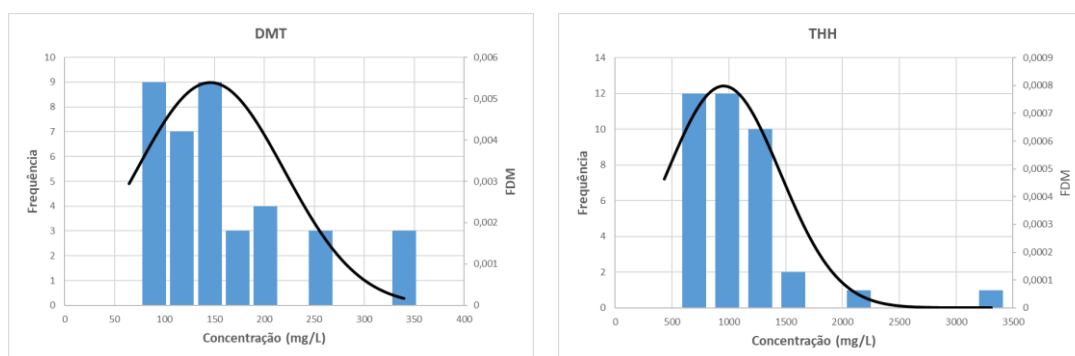


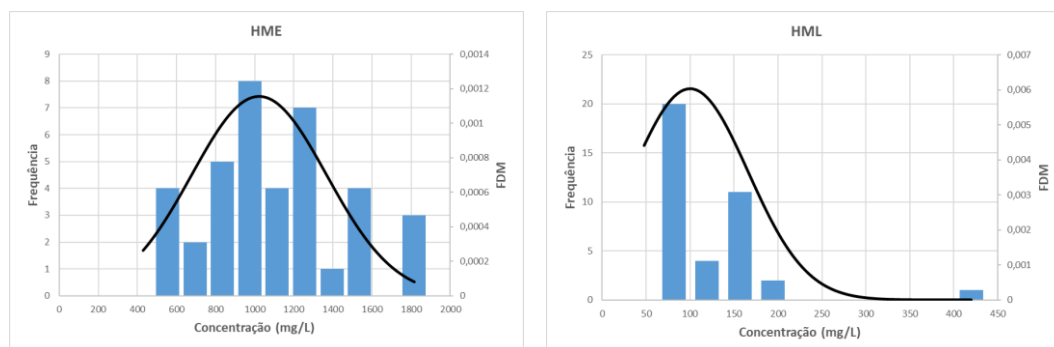
Figura 18. Gráfico da distribuição da concentração dos ativos nas amostras de ayahuasca de São Paulo.

Para facilitar a visualização e auxiliar em uma melhor avaliação dos resultados, foram construídos também gráficos de distribuição normal. Estes gráficos também são conhecidos como gráficos de distribuição de frequências. Representam um agrupamento de dados em classes, de tal forma que possibilita a contabilização do número de ocorrências em cada classe.

Na **Figura 19** e na **Figura 20**, estão representados os gráficos de distribuição para DMT e THH e HME e HML, respectivamente, nas amostras do Estado de São Paulo.



**Figura 19.** Distribuição da concentração dos analitos DMT e THH nas amostras do Estado de São Paulo.



**Figura 20.** Distribuição da concentração dos analitos HME e HML nas amostras do Estado de São Paulo.

Pode-se verificar que a distribuição de DMT, por exemplo, é mais elevada para as amostras na faixa de concentração entre 75 e 150 mg/L, mostrando um agrupamento destas amostras. No caso da THH, este agrupamento é ainda mais acentuado e se encontra na faixa entre 500 a 1500 mg/L, assim como para a HML, ficando esse ativo na maioria das amostras na faixa de 60 a 180 mg/L. Já a HME foi o analito que teve maior dispersão dos valores de concentração entre as amostras, sendo mais difícil encontrar uma tendência ou uma faixa de agrupamento.



Um estudo feito por Callaway *et al.*<sup>96</sup> (2005), determinou a variação na concentração dos ativos THH, HME e HML em 33 amostras de *B. caapi* colhidas em diversos locais do Brasil no mesmo dia (7 de outubro de 1995) durante o mesmo período (6:00 às 9:00 h). O mesmo foi feito para a *P. viridis* na determinação da concentração do DMT. É interessante apontar que os resultados mostraram uma grande variação na concentração dos ativos nas plantas, conforme ilustra a **Tabela 17** extraída do artigo citado anteriormente, o que ocorreu também nas amostras analisadas neste trabalho. Outra similaridade entre os resultados do artigo e deste trabalho, foi a proporção entre as substâncias HME e HML, que se apresentam com uma razão de cerca de 10 vezes em ordem de grandeza de concentração.

**Tabela 17.** Variação da concentração dos ativos em amostras de plantas de *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* (retirado de Callaway *et al.*<sup>96</sup>)

	<i>B. caapi</i> (mg/g)			<i>P. viridis</i> (mg/g)
	HME	HML	THH	DMT
Mínimo	0,31	0,03	0,05	0
Máximo	8,43	0,83	2,94	17,75
Média	4,83	0,46	1	7,5
DP	2,06	0,19	0,79	5,01

#### 4.3.2 Amostras coletadas na Europa

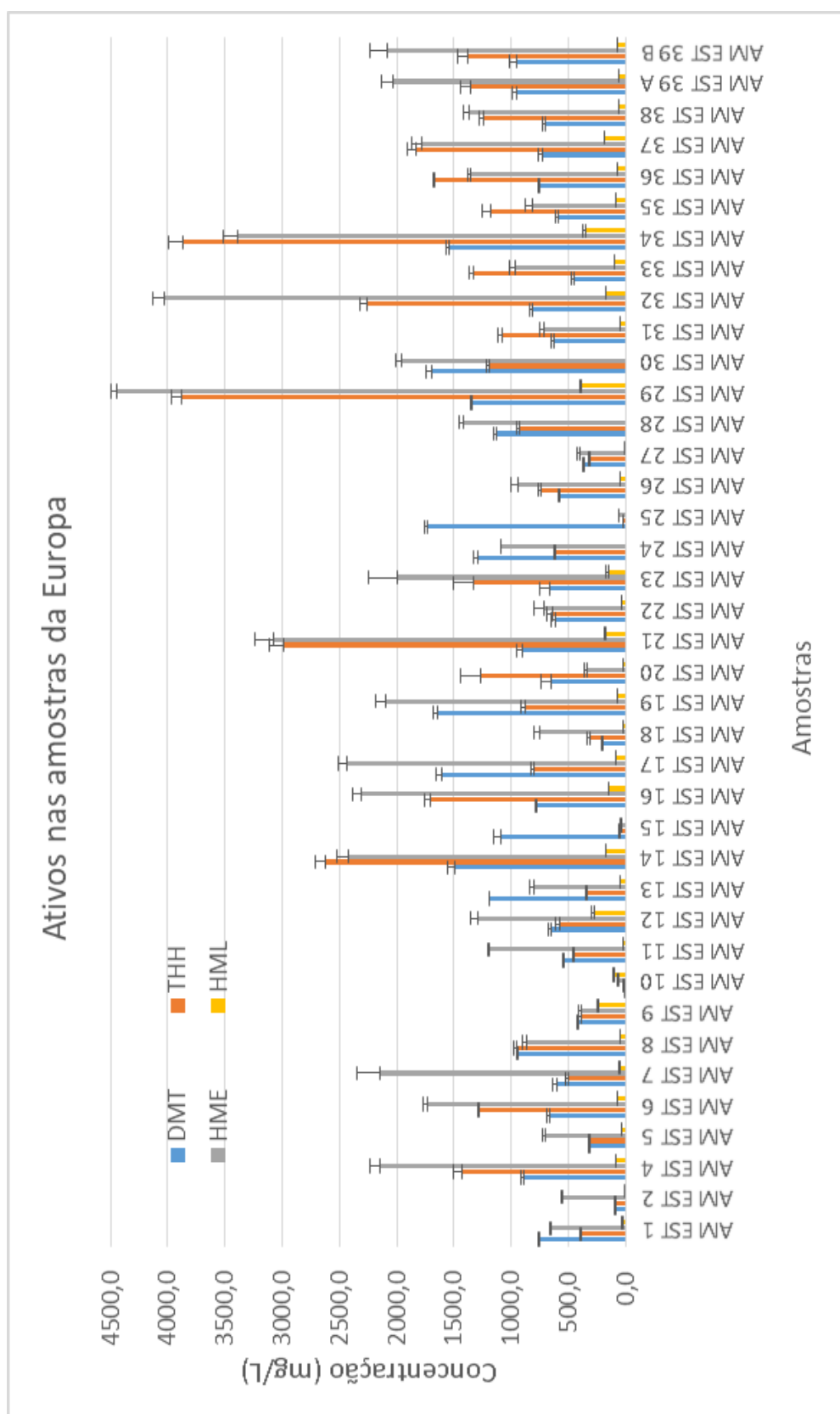
A **Tabela 2** dos anexos mostra os resultados obtidos para quantificação dos quatro ativos nas amostras de ayahuasca provenientes da Europa. Na **Figura 21** estes mesmos dados estão representados em um gráfico com as concentrações dos ativos nas diferentes amostras provenientes da Europa.

Neste caso, se observa uma heterogeneidade ainda maior entre as amostras. No geral, as concentrações de DMT encontradas nas amostras em questão foram muito mais altas, acima da média, quando comparadas ao grupo das amostras do Estado de São Paulo, todas produzidas pela União do Vegetal (UDV). Nas amostras EST24, EST25 e EST28, por exemplo, não detectamos presença de HML. Já na amostra EST3, nenhum dos ativos foi detectado. É importante ressaltar que não temos informações detalhadas sobre a produção das amostras provenientes da

Europa, bem como se o procedimento de preparo é similar ao das amostras provenientes do Estado de São Paulo ou não.

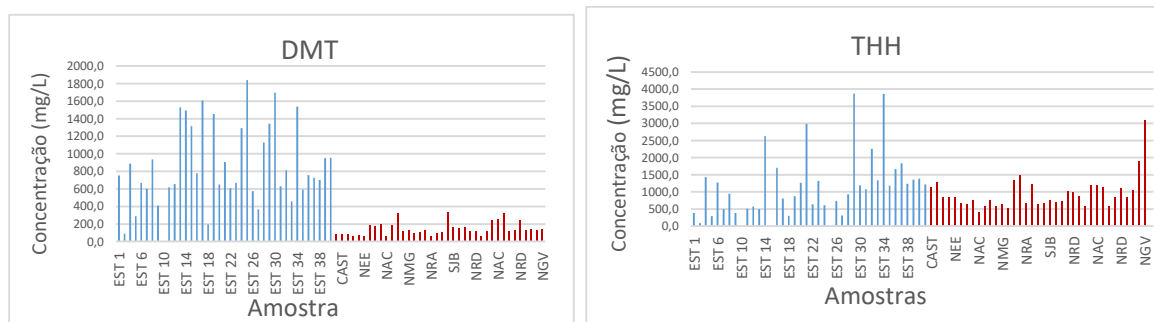
Teixeira *et al.*<sup>88</sup> descreveram o preparo das amostras nos grupos ayahuasqueiros Santo Daime, de onde algumas das amostras da Europa são provenientes. O preparo parece ocorrer de forma bem similar ao da UDV, porém, com algumas peculiaridades, como por exemplo, a evaporação da bebida até que se atinjam vários graus de concentração. Considerando a grande diferença na concentração dos ativos, é possível que as amostras sejam preparadas utilizando-se alguns procedimentos diferentes, como por exemplo, maior proporção de folhas de *P. viridis* em relação ao cipó da *B. caapi*, o que explicaria a maior concentração de DMT.

Algumas das amostras podem nem se tratar de ayahuasca, ou seja, seriam produtos de decocção de outras espécies de plantas ou até mistura de produtos sintéticos. Tendo em vista esta possibilidade, optou-se por analisar mais a fundo as amostras provenientes da Europa para verificar se, além dos ativos conhecidos na bebida tradicional, seriam detectados outros ativos que indicassem, por exemplo, o uso de outras substâncias de origem vegetal, ou até mesmo de substâncias sintéticas comerciais, prática não rara nos rituais não tradicionais de uso da ayahuasca, principalmente na Europa.<sup>89</sup>

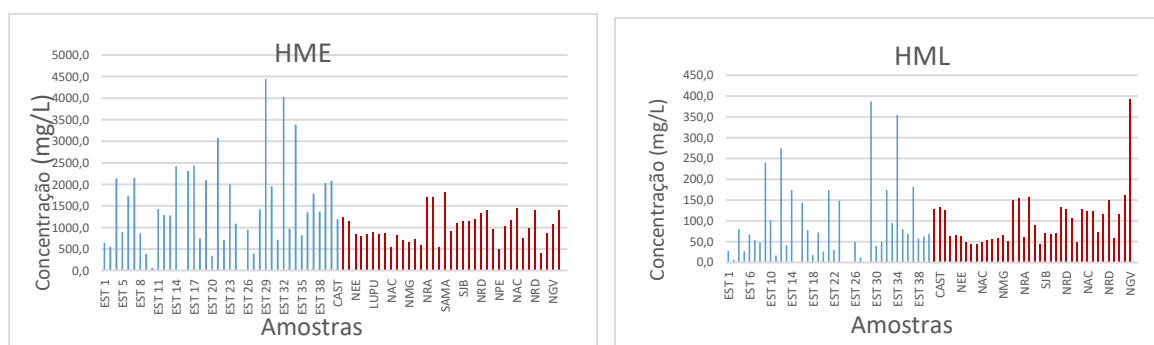


**Figura 21.** Gráfico da distribuição da concentração dos ativos nas amostras da Europa.

Assim como nas amostras provenientes de São Paulo, as amostras vindas da Europa apresentam grande variação da proporção dos ativos medidos. Um fato importante é a grande diferença entre as concentrações de alguns ativos nos dois grupos distintos, principalmente em relação ao DMT (**Figura 22** e **Figura 23**).

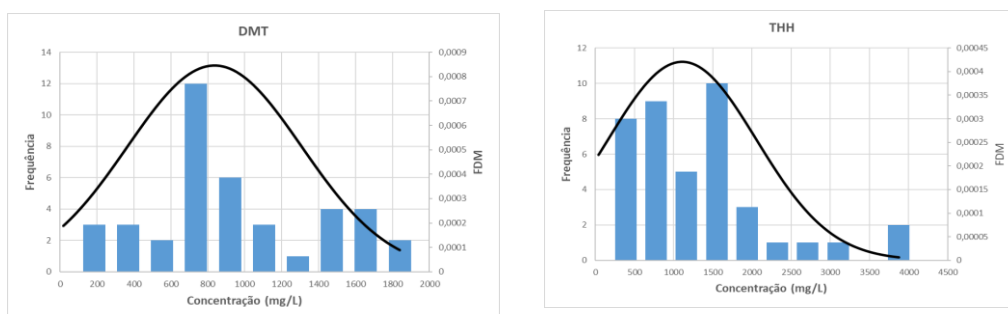


**Figura 22.** Gráficos da distribuição das concentrações de DMT e THH nas amostras da Europa (azul) vs. São Paulo (vermelho).

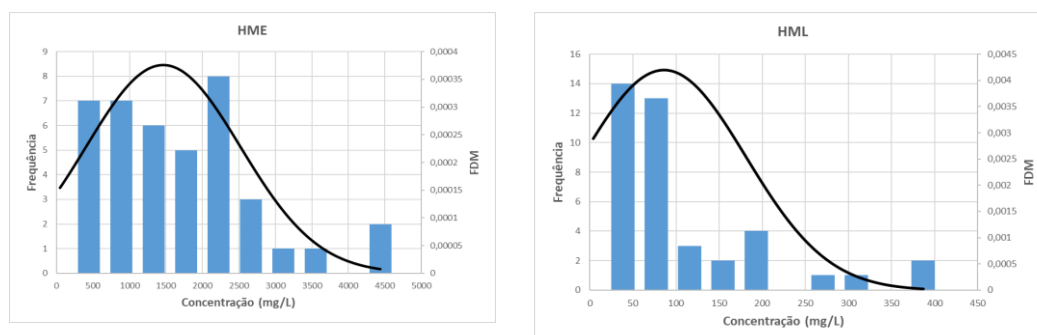


**Figura 23.** Gráficos da distribuição das concentrações de HME e HML nas amostras da Europa (azul) vs. São Paulo (vermelho).

Na **Figura 24** e na **Figura 25** estão representados os gráficos de distribuição de concentrações para DMT e THH e HME e HML, respectivamente, nas amostras da Europa. Pode-se verificar que a distribuição de DMT, por exemplo, é mais elevada para as amostras na faixa de concentração entre 800 e 1000 mg/L, mostrando um agrupamento destas amostras. Para a THH, a maior parte das amostras apresenta-se em uma faixa de concentração de 500 a 1500 mg/L. A HME é o ativo que aparece com maior faixa distribuição, indo de 500 a 2500 mg/L. Já a HML foi o analito que teve menor dispersão dos valores de concentração entre as amostras, e apresentou a maioria das amostras na faixa entre 25 e 100 mg/L.



**Figura 24.** Distribuição da concentração dos analitos DMT e THH nas amostras da Europa.



**Figura 25.** Distribuição da concentração dos analitos HME e HML nas amostras da Europa.

Quando os resultados obtidos pelas análises realizadas neste trabalho são comparados aos resultados encontrados na literatura (**Tabela 18**), conclui-se que os dados adquiridos se mostram bem coerentes. A variação dos ativos nestas amostras é grande, podendo, em alguns casos, atingir uma ordem de grandeza de 10 vezes, quando comparados o menor e o maior valor de concentração encontrados para um determinado analito. Na literatura, são observadas variações ainda maiores, porém, em amostragens muito pequenas. É interessante observar que a ordem de concentração dos alcaloides nas amostras segue uma tendência de ordem crescente de concentração sendo  $HME \sim THH > DMT > HML$ , exceto na análise por cromatografia a gás acoplada a detector de nitrogênio-fósforo, GC-NPD (*gas chromatography coupled to nitrogen-phosphorus detector*), onde a HML aparece mais concentrada.<sup>90</sup>

**Tabela 18.** Comparação da concentração dos ativos em amostras de ayahuasca utilizando diferentes técnicas de análise (literatura)

Artigo	DMT (mg/L)	THH (mg/L)	HME (mg/L)	HML (mg/L)	Nº de amostras	Técnica
Pires <sup>90</sup>	420-730	210-670	370-830	640-1720	8	GC-NPD
Callaway <sup>91**</sup>	160 - 5840	450-5260	450-6250	100-900	20	HPLC-FD
Gambelunghé <sup>92</sup>	240	-	340	60	1	GC-MS
McIlhenny <sup>93</sup>	120-3190	1222-11900	910-16000	54-1550	6	LC-MS/MS
Gaujac <sup>94</sup>	100-1810	-	-	-	7	GC-MS
Linard <sup>95</sup>	402-2070	849.5-2052.5	294.5-2893.8	27.5-181.3	9	HPLC-DAD
São Paulo	62-340	402-3308	414-1816	44-420	32	LC-MS/MS
Europa	88-1840	11-2256	59-4032	5-274	22	LC-MS/MS

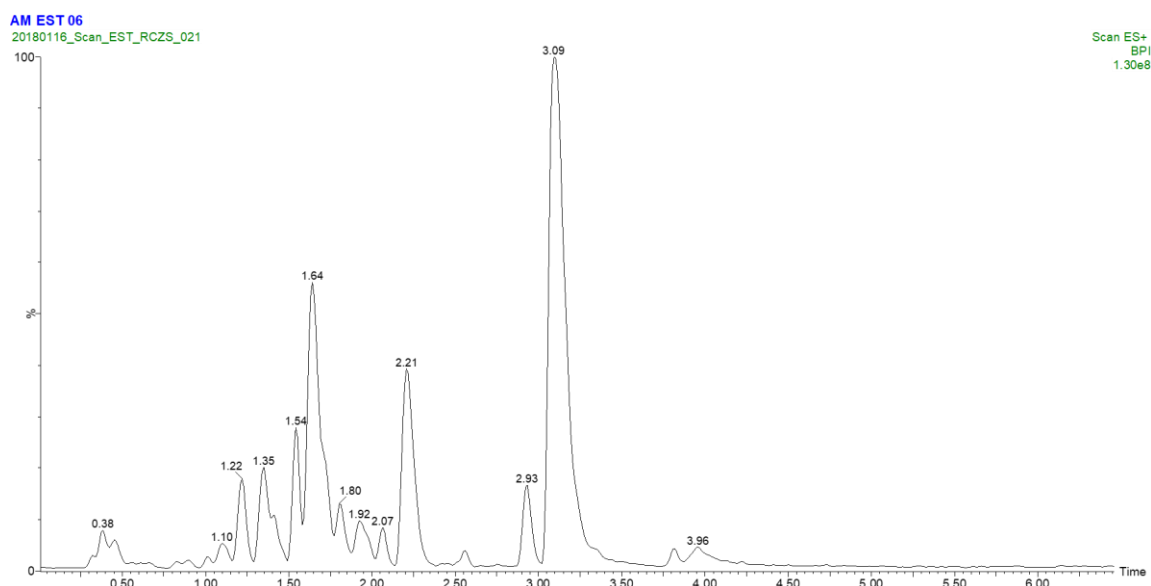
\*\*Foram consideradas somente as amostras provenientes da UDV para fins de comparação.

Callaway *et al.*, em 2005, determinaram a concentração de DMT na *P. viridis* a fim de medir a produção circadiana da substância pela planta (ciclo de 24 horas). Foram feitas coletas de 3 em 3 horas e o resultado observado foi que os níveis de DMT na planta aumentavam até às 6:00 (manhã), decaíam das 6:00 às 9:00 e depois, gradualmente, subiam até o ápice às 18:00, voltando a decrescer aos níveis basais após este horário. São apontados dois motivos para este efeito, um é o de que a planta produz DMT para se proteger da radiação solar e o segundo é que a DMT seria produzida para absorver essa radiação e que o uso dessa radiação está ligado a algo além da autopreservação<sup>96</sup>.

#### 4.4 Avaliação do perfil químico das amostras de ayahuasca por LC-MS (*fingerprinting*)

Foram realizadas análises por LC-MS para todas as amostras conforme descrito no item 3.4. A **Figura 26** ilustra um cromatograma representativo, obtido para uma das amostras de ayahuasca por meio de LC-MS.

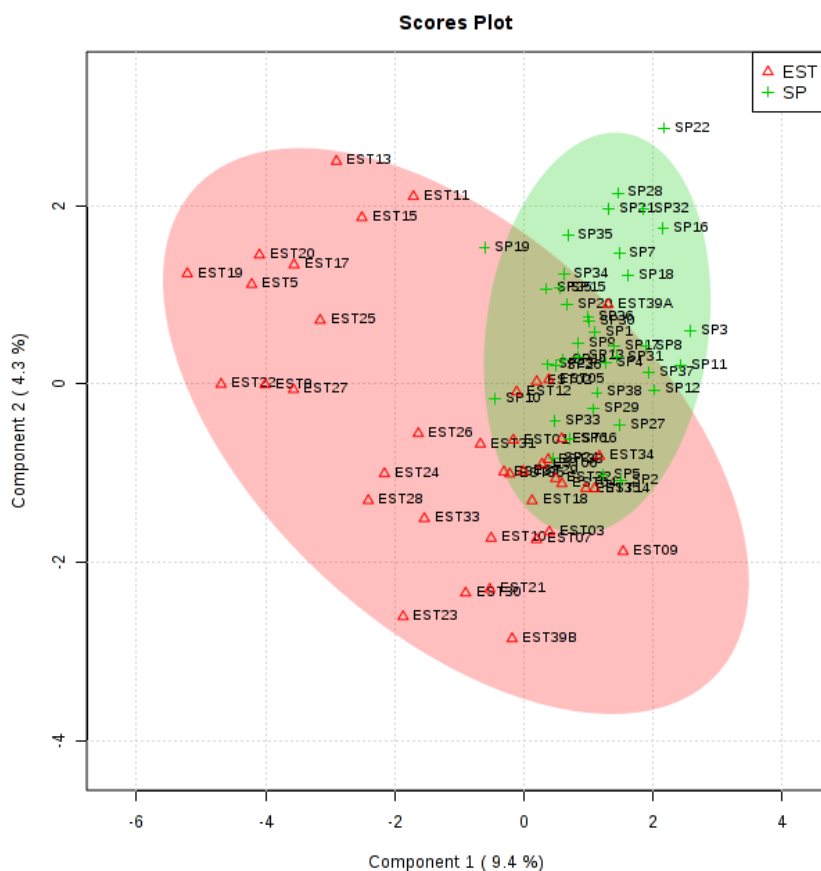
Foram avaliados os perfis gerados nos cromatogramas após realizada a exportação dos dados para formato adequado e posterior pré-tratamento utilizando o *software* R (extração dos íons, alinhamento dos picos, normalização, geração da planilha com dados, etc.). Os dados obtidos foram então analisados utilizando análise estatística multivariada por meio da plataforma *online MetaboAnalyst 4.0*<sup>97</sup>, utilizando-se o modelo PLS-DA para avaliação da classificação das amostras.



**Figura 26.** Cromatograma obtido empregando-se LC-MS para uma amostra de ayahuasca. Condições cromatográficas: volume de injeção 1  $\mu$ L; coluna Acquity (BEH) C18 (50 mm  $\times$  2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) Waters; FM - água (solvente A) e metanol (solvente B); programa de gradiente linear: 0 min - 90:10 v/v; 10 min - 10:90 v/v; 11 min - 90:10 v/v.

Em uma primeira análise foram avaliadas as amostras provenientes de São Paulo (SP), com as provenientes da Europa (EST).

A **Figura 27** mostra os resultados para o modelo PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises de LC-MS. Observa-se que não foi possível obter a classificação para as amostras de São Paulo em relação às da Europa.

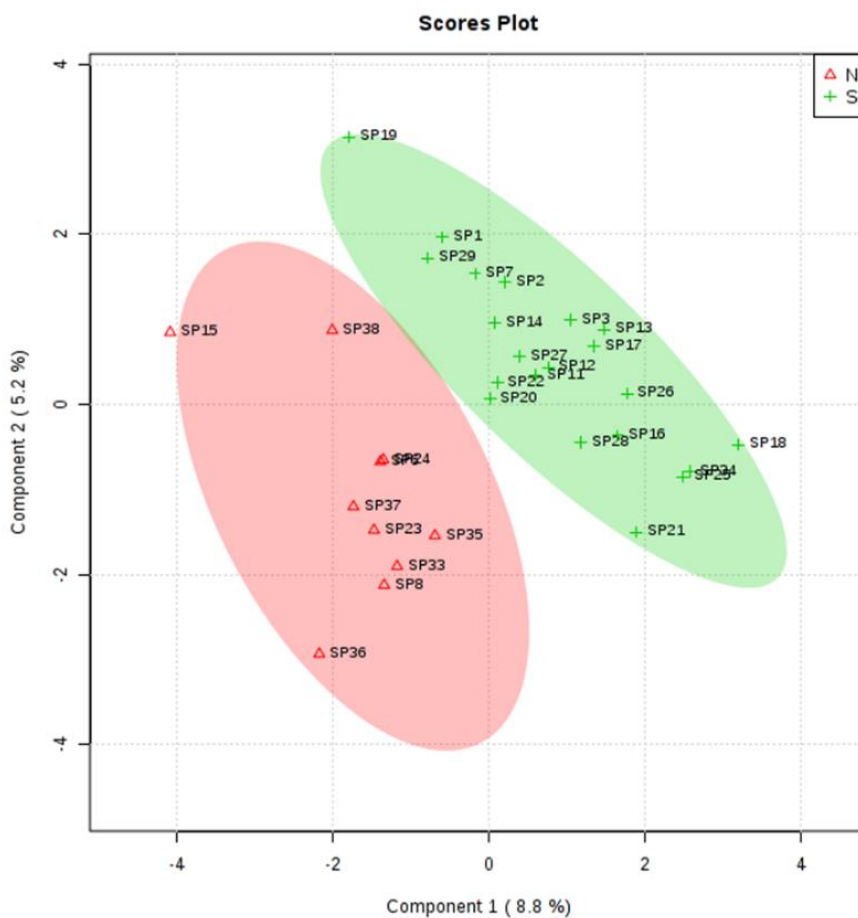


**Figura 27.** Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises de LC-MS das amostras de São Paulo (SP) x Europa (EST).

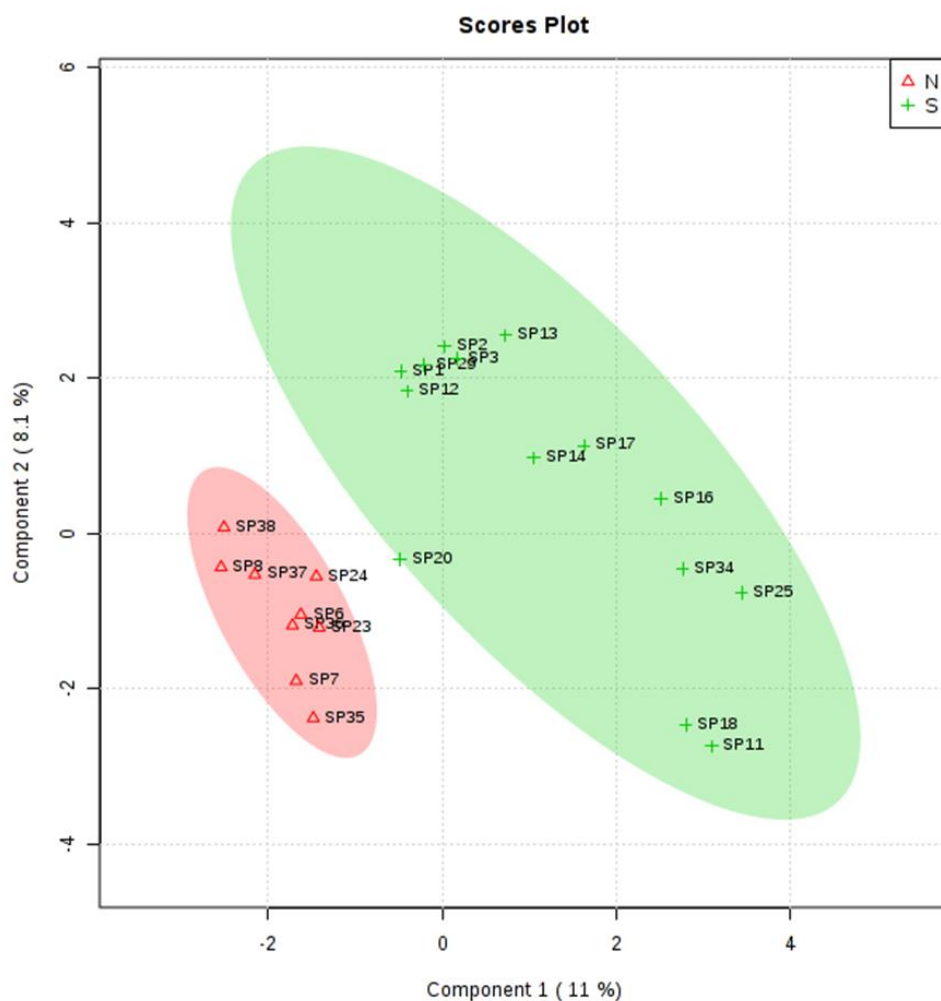
Para algumas amostras provenientes da UDV, tínhamos informações como por exemplo, a origem do material vegetal usado no preparo. Não é raro que os grupos ayahuasqueiros utilizem plantas vindas de outras regiões do Brasil, principalmente do Norte (Amazonas, Roraima, Acre entre outros), que é a região com maior tradição no uso dessa bebida e onde a concentração de grupos ayahuasqueiros e o cultivo das plantas é bem maior. Sendo assim, a PLS-DA foi utilizada para verificar a possibilidade de classificação das amostras cujas origens das plantas eram conhecidas, porém os resultados não mostraram boa classificação entre os grupos. A **Figura 28** e a **Figura 29** ilustram os dados tratados a partir de PLS-DA. No primeiro gráfico (**Figura 28**) foi analisada a origem do Mariri (*B.caapi*) e no segundo gráfico (**Figura 29**) a origem da chacrona (*P. viridis*). Mais uma vez, não foi possível obter a classificação das amostras como se esperava. Nota-se, porém, no gráfico da **Figura 29**, uma classificação parcial



para as amostras na componente 1, entretanto, menos de 20% dos dados são explicados por este modelo.

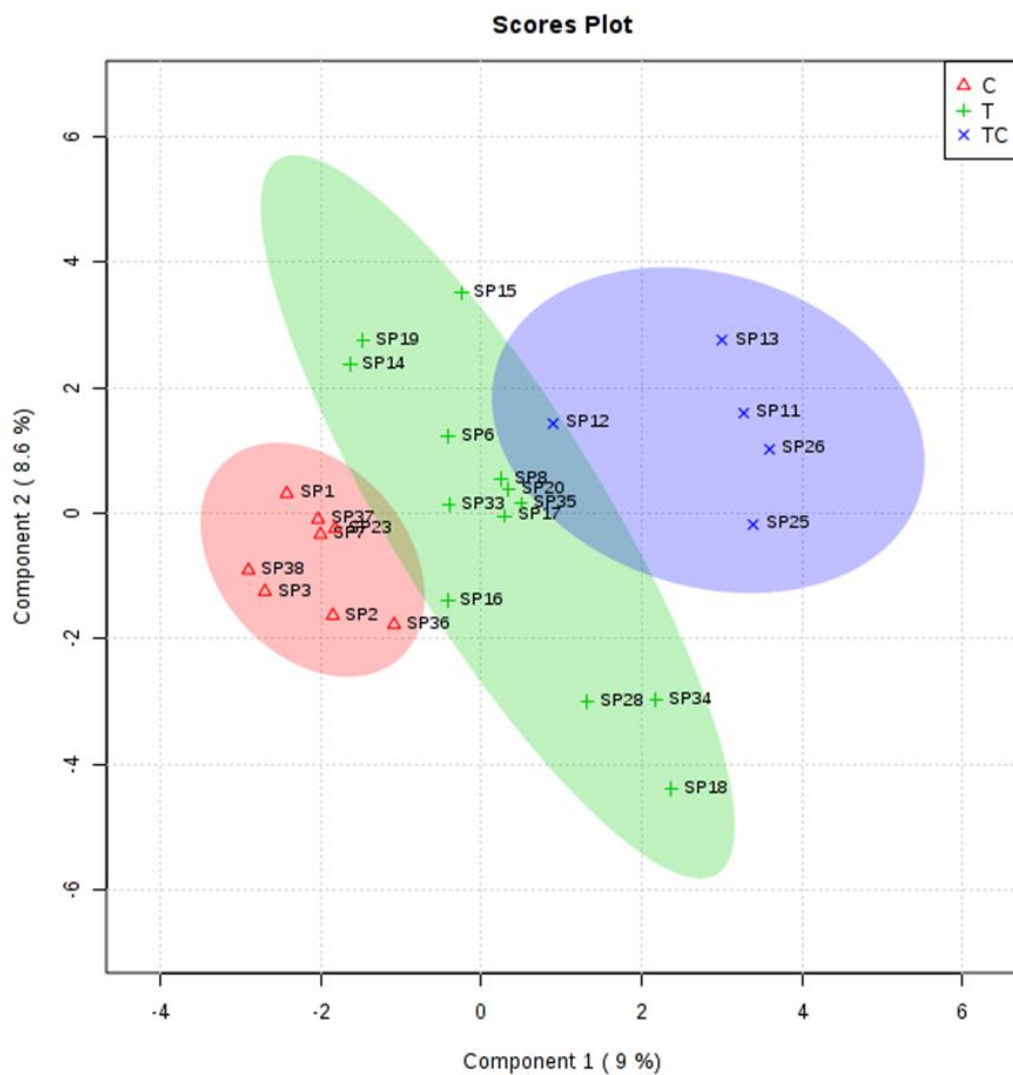


**Figura 28.** Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras preparadas em São Paulo (SP) avaliando-se o Mariri (*B.caapi*) vindo da região Norte (vermelho) com aquele da região Sudeste (verde) do Brasil.



**Figura 29.** Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras de São Paulo (SP) avaliando-se chacrona (*P. viridis*) vindo da região Norte (vermelho) com aquele da região Sudeste (verde).

Haviam ainda informações sobre duas variedades da chacrona usadas nos preparos da ayahuasca (Caupuri e Tucunacá). Alguns preparos utilizaram plantas de uma única variedade, outras utilizaram uma mistura das duas variedades. O gráfico resultante do tratamento dos dados por meio do modelo PLS-DA para as amostras em questão é mostrado na **Figura 30**. Também para estas amostras o modelo utilizado não mostrou classificação entre as amostras.



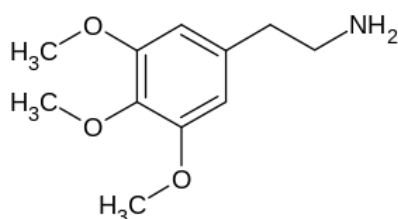
**Figura 30.** Gráfico gerado utilizando-se o modelo de PLS-DA com os dados obtidos a partir das análises por LC-MS das amostras de São Paulo (SP) avaliando-se a variedade de chacrona (*P. viridis*) utilizada no preparo, sendo Caupuri (vermelho) Tucunacá (verde) e ambas (azul).

#### 4.5 Investigação sobre a presença de adulterantes das amostras de ayahuasca da Europa

Havia indícios de que as amostras provenientes da Europa pudessem conter substâncias adulterantes, tanto sintéticas como naturais. Esta é uma prática comum em alguns grupos ayahuasqueiros não tradicionais, principalmente fora do Brasil. Sendo assim, as análises por LC-MS realizadas para as amostras recebidas da Europa (conforme descrito no item 3.4) foram utilizadas também para investigar a presença destas substâncias.

Dentre todas as amostras, chamou a atenção a amostra EST3, na qual não foi possível detectar nenhum dos ativos da ayahuasca. Foram requisitadas à pesquisadora Helle Kaasik informações adicionais sobre as amostras e seus possíveis contaminantes. Em suas anotações haviam informações de que a amostra EST3 tratava-se de uma decocção de planta, chamada por ela de “*cactus tea*”, também conhecida como cacto de São Pedro (*Echinopsis pachanoi*)<sup>98</sup> e que essa bebida poderia conter mescalina (**12**) - **Figura 31**.

A mescalina é um alcaloide alucinógeno presente em algumas plantas utilizadas em rituais por alguns grupos tribais nos Estados Unidos e México, e também têm sido alvo de estudos contra adição a drogas<sup>99</sup>. Não é incomum nos grupos chamados de psiconáuticos a utilização de outras substâncias alucinógenas de origem natural em seus ‘rituais’ ou sessões, como é o caso do cacto de São Pedro e do peiote (*Lophophora williamsii*)<sup>100</sup>, que também contém mescalina.



(12)

**Figura 31.** Estrutura molecular da mescalina (**12**).

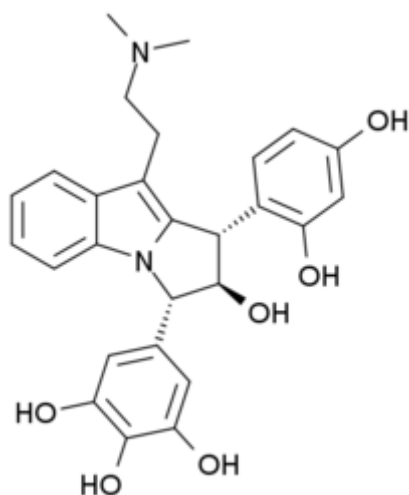
O resultado da análise confirmou a informação de que a amostra em questão não se tratava de ayahuasca, pois não continha os ativos esperados no chá e

confirmou ainda a presença de um íon de razão  $m/z$  212, compatível com o íon da molécula protonada da mescalina, de fórmula molecular  $C_{11}H_{17}NO_3$ .

Outra informação recebida após a realização das análises foi a de que a amostra EST10 poderia tratar-se de um extrato de *Peganum harmala* e que seria oferecida aos participantes da cerimônia pelos chamados facilitadores, aproximadamente 30 minutos antes da ingestão da ayahuasca com o intuito de “preparar o corpo para a ayahuasca”. O motivo seria a grande concentração dos ativos HME, HML e THH, beta-carbolinas inativadoras da MAO. De acordo com as análises feitas, a amostra EST10 possui proporcionalmente menos DMT e mais beta-carbolinas em comparação com as outras amostras do grupo, porém, essas concentrações de beta-carbolinas não são tão expressivas quanto em muitas das amostras de ayahuasca.

Jonathan Ott<sup>39</sup> cita em seu artigo sobre a sinergia obtida entre outras fontes naturais de DMT e de inibidores de monoaminoxidase, apresentando uma vasta gama de combinações de substâncias que reproduzem o mesmo efeito da ayahuasca, chamadas de “análogos da ayahuasca”, anahuasca e pharmahuasca, entre elas podemos citar além da *P. harmala* e a Jurema Preta (*Mimosa hostilis*).

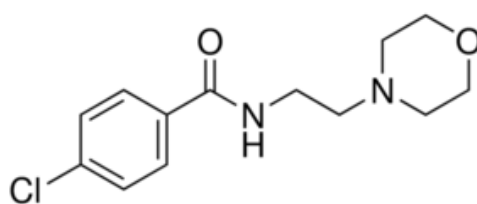
É possível que além do uso da *P. harmala*, como pré-ayahuasca, os facilitadores nestes grupos menos tradicionais usem este extrato para complementar a composição de beta-carbolinas na ayahuasca ou nos preparados chamados de anahuasca. Também é comum o uso de plantas ricas em DMT como é o caso da Jurema (*Mimosa hostilis*), outra planta de uso indígena tradicional no Brasil e que também contém grandes concentrações DMT<sup>101</sup>. Além de DMT, a Jurema contém também uma substância com propriedades alucinógenas conhecida como yuremamina (13) - **Figura 32**.



(13)

**Figura 32.** Estrutura molecular da yuremamina (13).

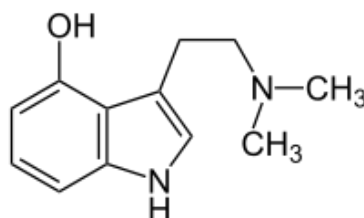
Ainda segundo informações da pesquisadora Kaasik, havia a possibilidade de algumas das amostras conterem extrato de Jurema (*Mimosa hostilis*). Durante a investigação dos contaminantes foi detectado, nas amostras EST09, EST15 e EST25, o íon de  $m/z$  477, compatível com a yuremamina protonada. Havia também uma suspeita de contaminação por substâncias sintéticas em algumas das amostras. Nas amostras EST15 e EST25, foi detectada a presença da substância moclobemida (14) - **Figura 33**. A moclobemida é um fármaco que age como inibidor reversível da MAO e é utilizado no tratamento de patologias de tipo depressivo, como distímia e depressão.<sup>102</sup>



(14)

**Figura 33.** Estrutura molecular da moclobemida (14).

Também foram encontrados nestas amostras íons de  $m/z$  205 compatíveis com as substâncias psilocina (4-HO-DMT) (**15**) - **Figura 34**. A psilocina é um alcaloide psicoativo presente nos cogumelos alucinógenos do gênero *Psilocybe*.<sup>103</sup>

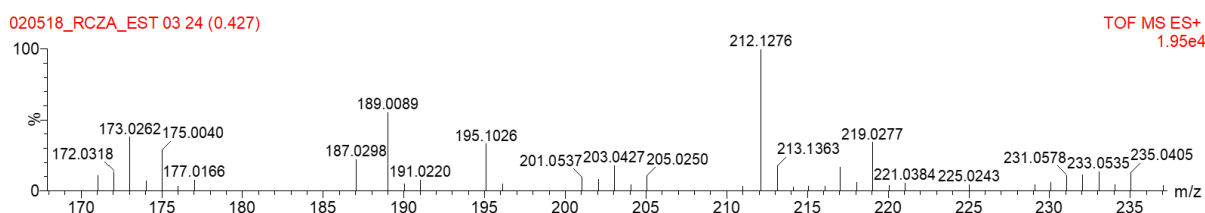


(15)

**Figura 34.** Estrutura molecular da psilocina (**15**).

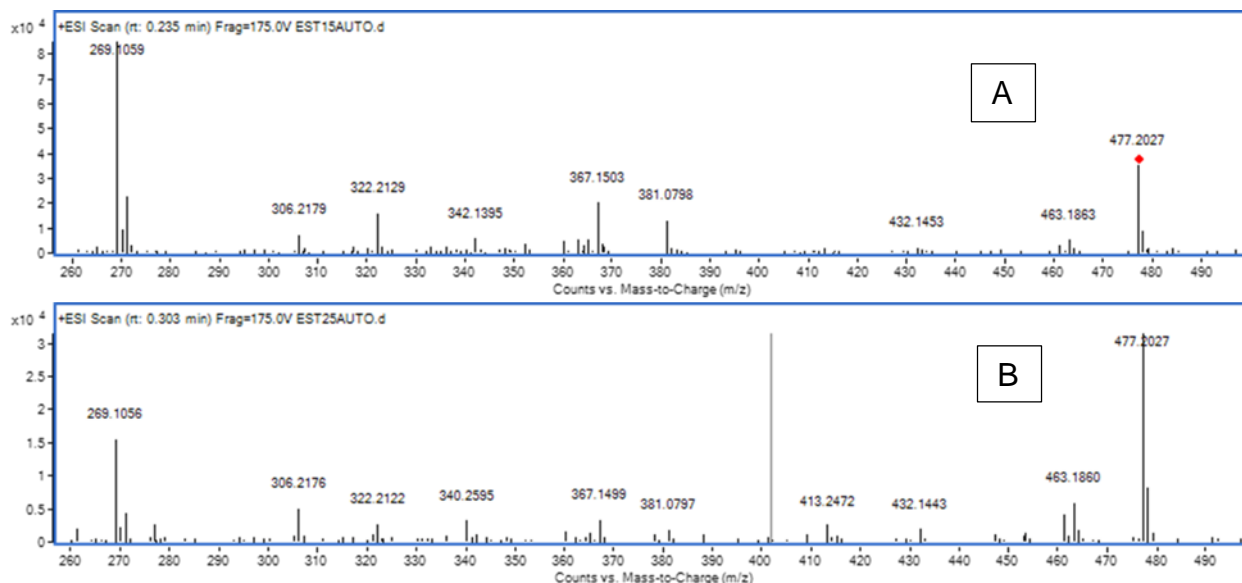
Com intuito de confirmar a presença das substâncias acima citadas nas amostras em questão, foram realizadas análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e análises de MS/MS (análise de íons produto), de conforme descrito no item 3.5. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

A **Figura 35** mostra o espectro de massas de alta resolução obtido para a amostra EST03. O espectro mostra a presença dos íons de  $m/z$  212,1276, compatível com a massa da molécula protonada da mescalina ( $[M+H]^+$ -  $C_{12}H_{17}NO_3$  - massa exata 212,1287 – erro 5,18 ppm).



**Figura 35.** Espectro de massas de HRMS para as amostras EST03 evidenciado o íon de  $m/z$  212,1275, compatível com a massa da molécula protonada da mescalina.

Na **Figura 36** estão representados os espectros de HRMS feitos para as amostras EST15 (**A**) e EST25 (**B**) onde aparecem os íons 269 e 477 compatíveis com a massa molecular da molécula protonada das substâncias moclobemida e yuremamina, respectivamente.

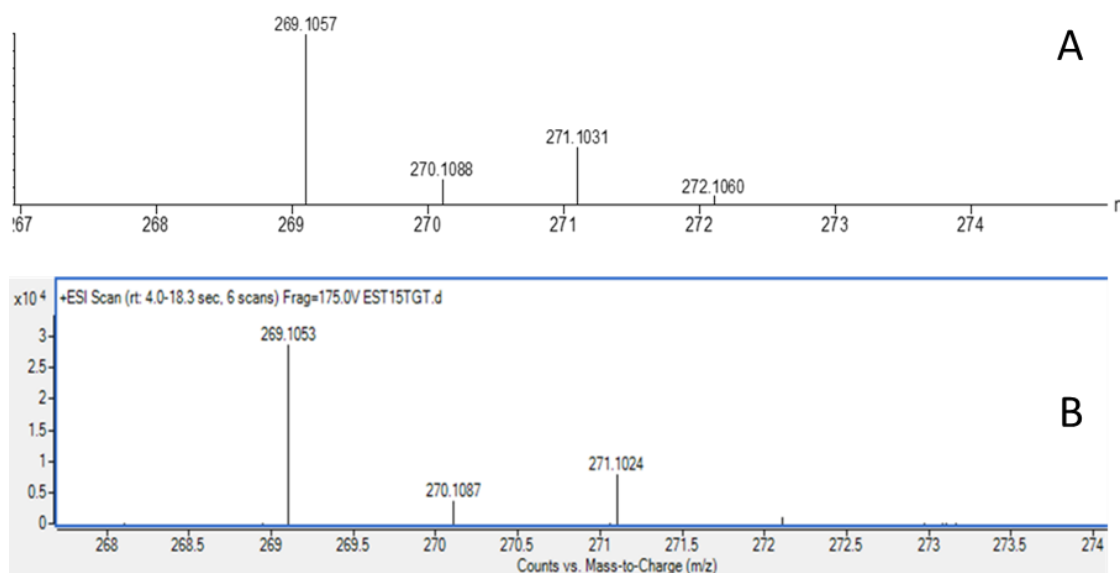


**Figura 36.** Espectro de massas de HRMS para as amostras EST15 (A) e EST 25 (B) onde estão evidenciados os íons de  $m/z$  269 e  $m/z$  477 compatíveis com a massa molecular das moléculas protonadas das substâncias moclobemida e yuremamina, respectivamente.

Os espectros da **Figura 36** mostram a presença dos íons de  $m/z$  269,1059 para amostra EST15 e 269,1056 para amostra EST25, compatíveis com a massa da molécula protonada da moclobemida ( $[M+H]^+$  -  $C_{13}H_{18}N_2ClO_2$  - massa exata 269,1057 - erro 0,37 ppm (A) e 0,74 (B)) e dos íons de  $m/z$  477,2027 para ambas as amostras, também compatível com a massa da molécula protonada da yuremamina ( $[M+H]^+$  -  $C_{27}H_{29}N_2O_6$  - massa exata 477,2026 - erro 0,20 ppm) permitindo a confirmação das fórmulas moleculares para ambas as moléculas, sugerindo a contaminação das amostras.

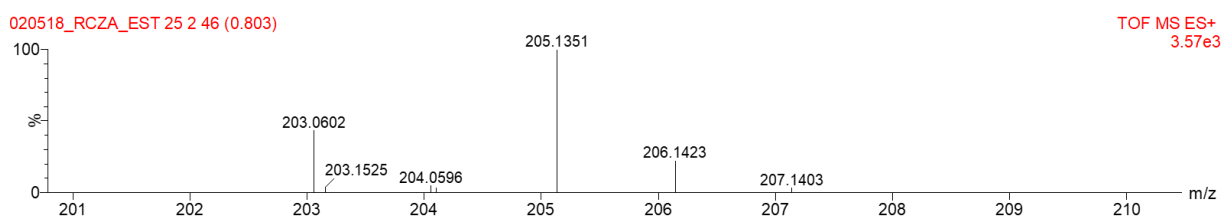
No caso específico da moclobemida é possível ainda inferir sobre a presença da substância nas amostras citadas pela indicação de presença de cloro no íon encontrado, a presença desse elemento é comprovada pelo padrão isotópico mostrado no espectro de massas de HRMS. Na **Figura 37** encontra-se um modelo isotópico teórico para a molécula protonada da moclobemida em comparação com o espectro obtido para a amostra EST15. O modelo isotópico foi construído utilizando-se o *software* MassLynx 4.1 V da Waters.





**Figura 37.** Comparação do modelo isotópico da molécula protonada da moclobemida ( $C_{13}H_{18}N_2ClO_2$ ) (A) com o íon encontrado no espectro obtido para a amostra EST15 (B).

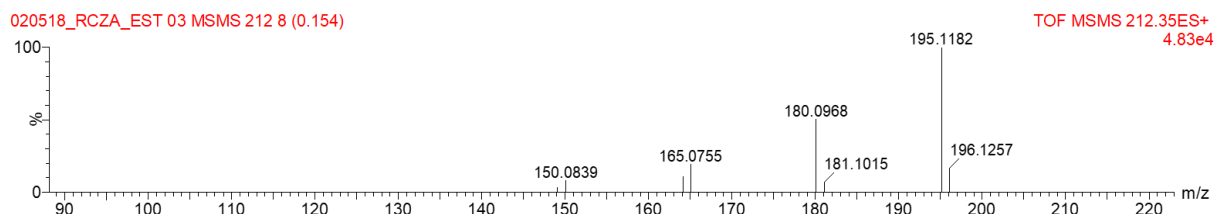
Já a **Figura 38** mostra os espectros de massas de HRMS obtidos para as amostras EST25. O espectro mostra a presença dos íons de  $m/z$  205,1351, compatível com a massa da molécula protonada da psilocina ( $[M+H]^+$  -  $C_{12}H_{17}N_2O$  - massa exata 205,1341 - erro 4,87 ppm). O mesmo íon foi encontrado também na amostra EST15.



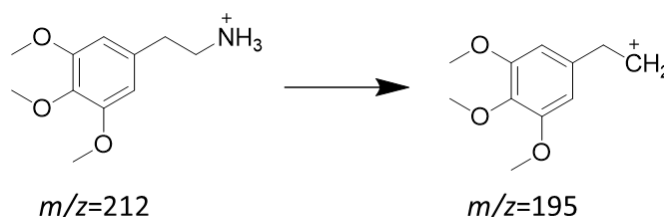
**Figura 38.** Espectro de massas de HRMS para a amostra EST15, onde está evidenciado o de  $m/z$  205,1333, compatível com a massa da molécula protonada da psilocina.

Além das análises de HRMS foram realizadas ainda análises de MS/MS (íons produto) para os íons em questão. Na **Figura 39** encontra-se o espectro de

fragmentação para o íon 212, que sugere ser a molécula protonada da mescalina, onde são mostrados os fragmentos de  $m/z$  195 e 180. Estes fragmentos são compatíveis com as transições já publicadas na literatura em relação à fragmentação da mescalina protonada<sup>104</sup>. Uma sugestão das estruturas dos fragmentos é mostrada na **Figura 40**.

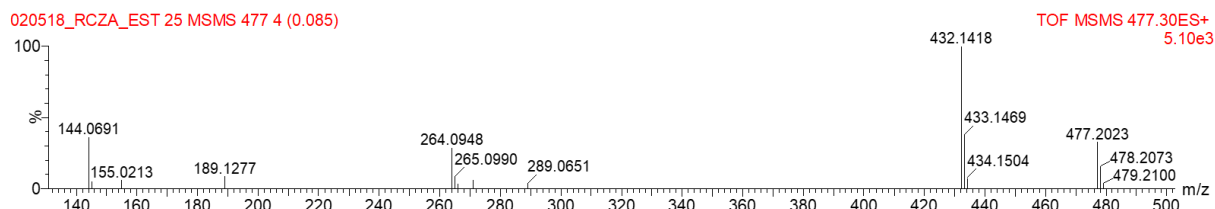


**Figura 39.** Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon  $m/z$  212 indicando presença de mescalina na amostra EST03.

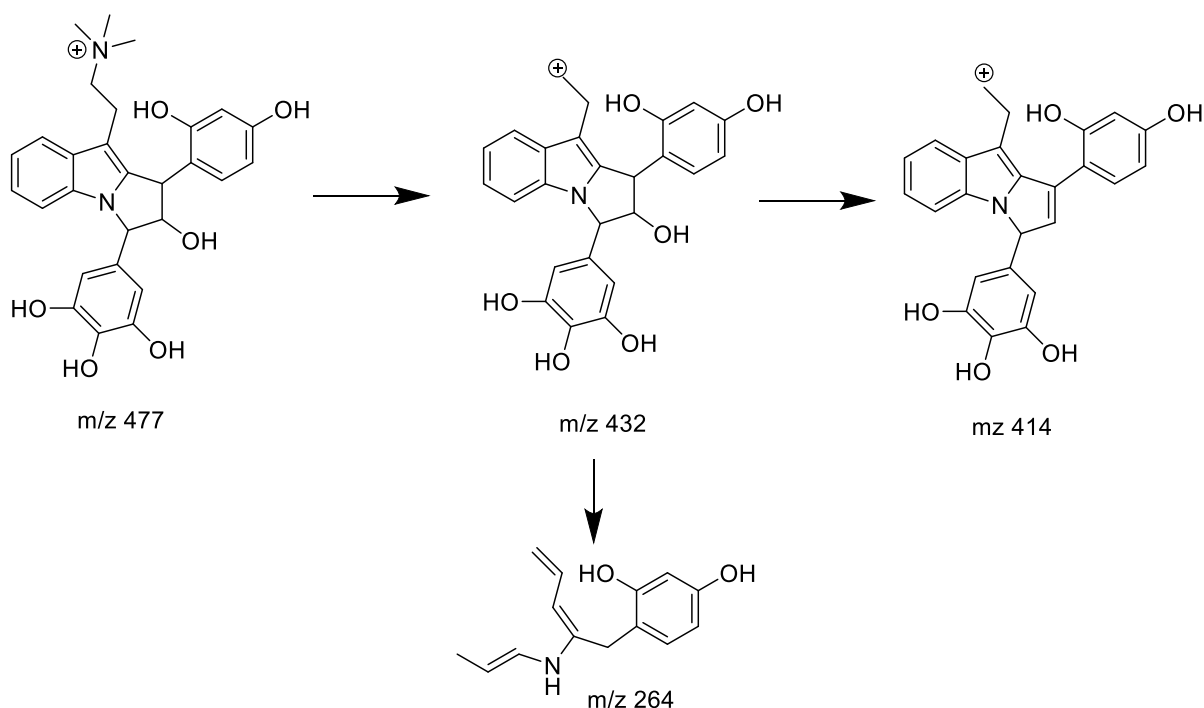


**Figura 40.** Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da mescalina.

Na **Figura 41** encontra-se o espectro de fragmentação do íon 477 onde são mostrados os fragmentos de  $m/z$  432 e 264. Estes fragmentos são compatíveis com o que já foi publicado na literatura para a yuremamina<sup>105</sup>. Uma sugestão das estruturas dos fragmentos é mostrada na **Figura 42**.



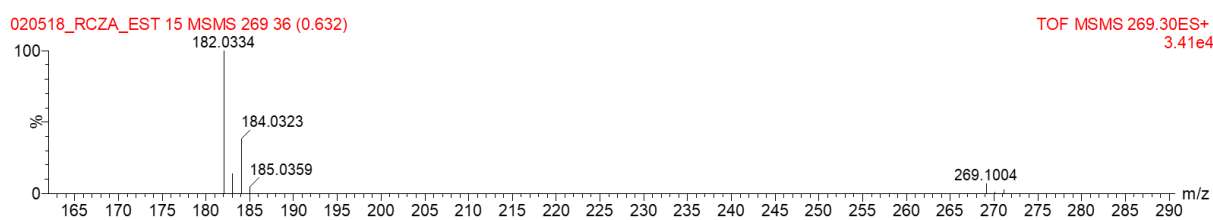
**Figura 41.** Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon  $m/z$  477,2023 indicando presença de yuremamina na amostra EST15.



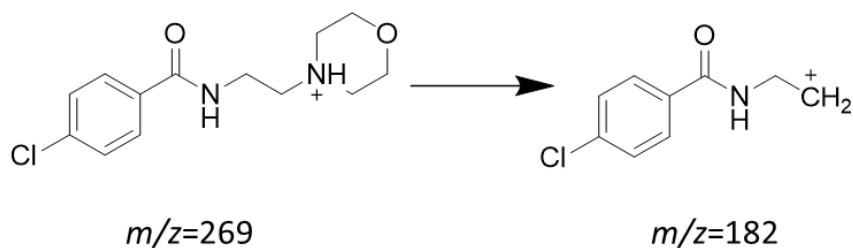
**Figura 42.** Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da yuremamina<sup>104</sup>.

Analisando-se o padrão de fragmentação do íon 477, foi possível confirmar a presença da yuremamina nas amostras EST09, EST15 e EST25.

Já na **Figura 43** encontra-se o espectro de fragmentação do íon 269 onde é mostrado o fragmento de  $m/z$  182, com o padrão isotópico indicando a presença de um Cl. Uma sugestão das estruturas dos fragmentos é mostrada na **Figura 44**.

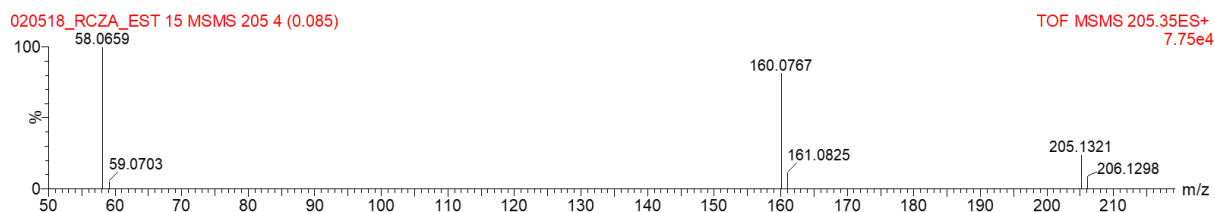


**Figura 43.** Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon  $m/z$  269 indicando presença de moclobemida na amostra EST15.

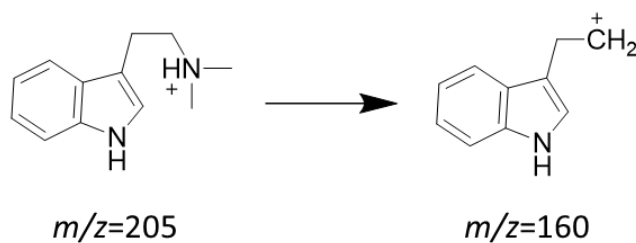


**Figura 44.** Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da moclobemida.

Por fim, a **Figura 45** mostra o espectro de fragmentação do íon 205 onde é mostrado o fragmento de  $m/z$  160. Estes fragmentos são compatíveis com o que já foi publicado na literatura para a psilocina<sup>106</sup>. Uma sugestão das estruturas dos fragmentos é mostrada na **Figura 46**. A psilocina também foi encontrada na amostra EST25.



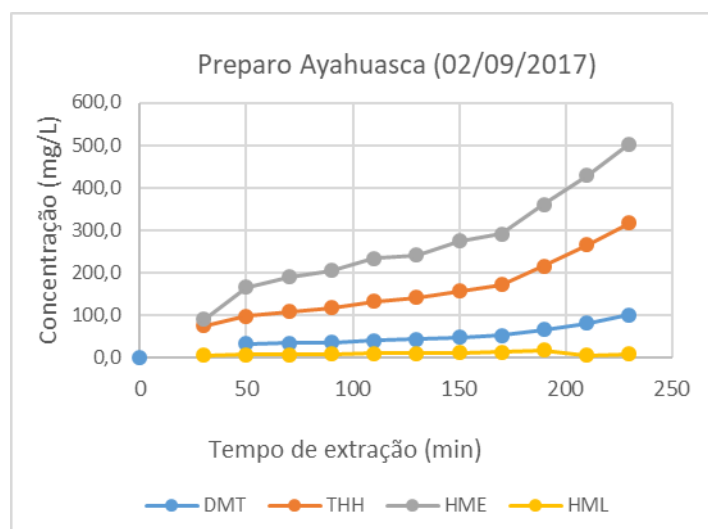
**Figura 45.** Espectro de íons produto (MS/MS) para o íon  $m/z$  205 indicando presença de psilocina na amostra EST15.



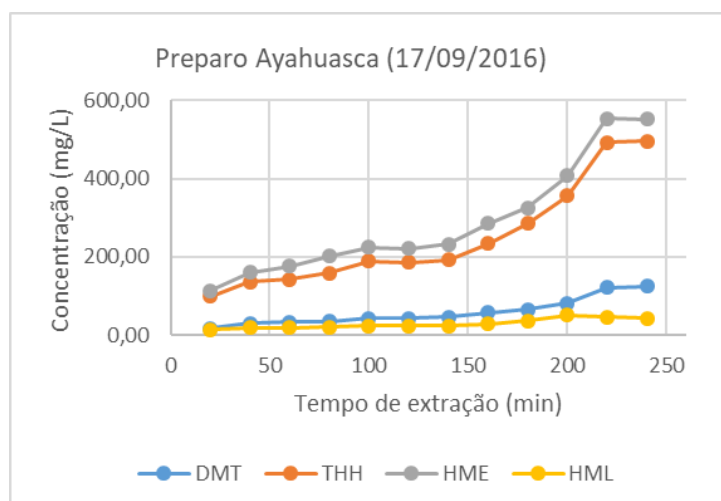
**Figura 46.** Sugestão para as espécies geradas após fragmentação da psilocina.

#### 4.6 Cinética do preparo da ayahuasca

Foram acompanhados dois preparos de ayahuasca em dias distintos, um em setembro de 2016, e outro em setembro de 2017. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.1 e analisadas para quantificação dos quatro ativos. Os gráficos da cinética de extração dos ativos para os dois preparos são mostrados na **Figura 47** e **Figura 48**.

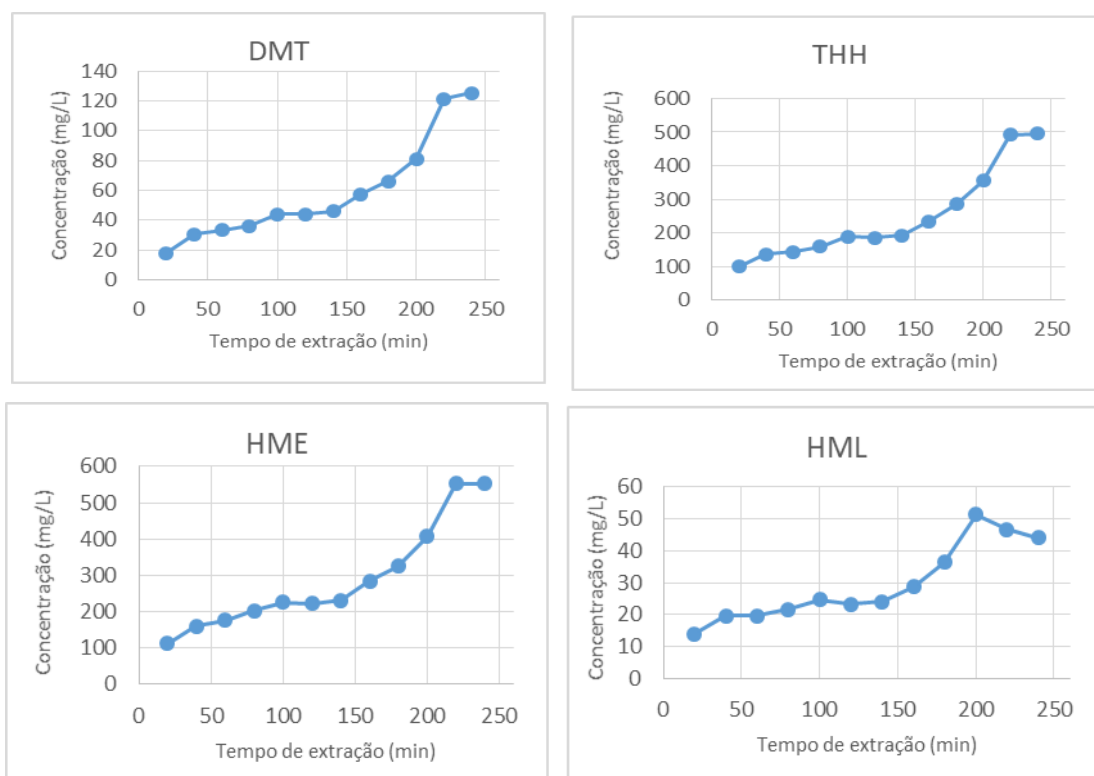


**Figura 47.** Gráfico de cinética de extração dos ativos no preparo da ayahuasca no dia 17/09/2016.

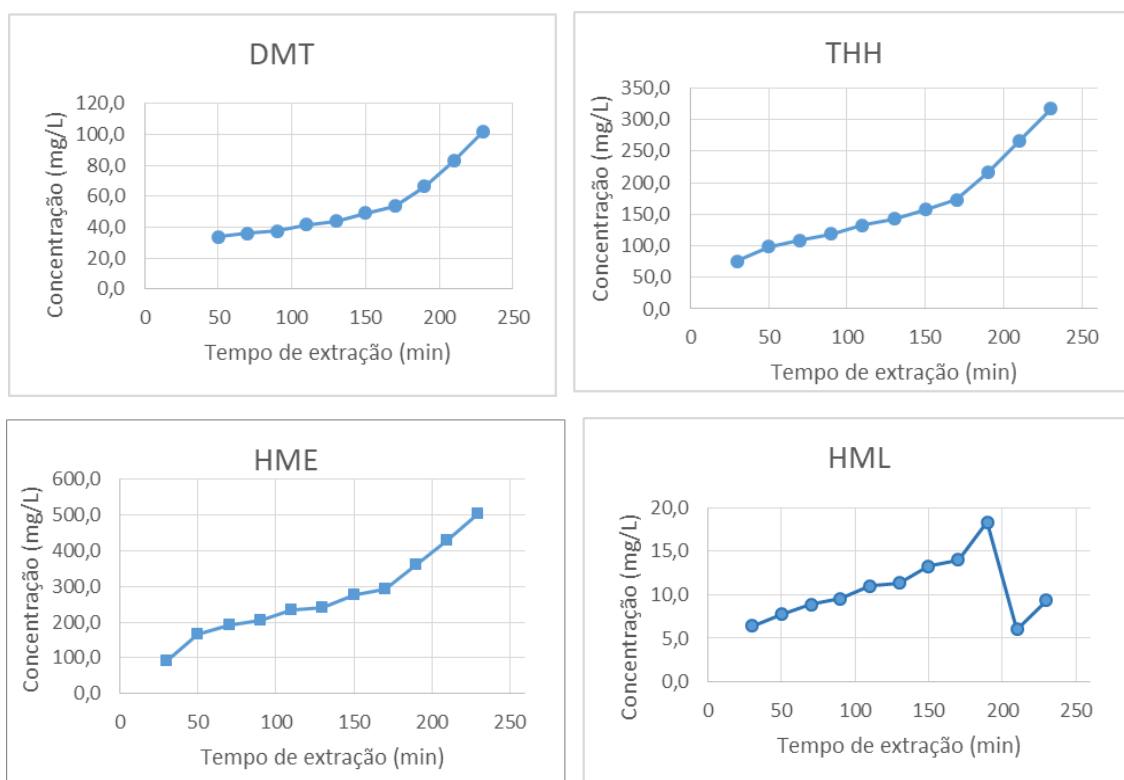


**Figura 48.** Gráfico de cinética de extração dos ativos no preparo da ayahuasca no dia 02/09/2017.

Analisando-se os resultados é possível observar que, durante o preparo, os ativos são extraídos gradativamente e suas concentrações aumentadas após o tempo de cerca de 250 minutos, sendo que este valor coincide com o início da evaporação mais acentuada da mistura (**Figura 49** e **Figura 50**). Neste momento, observa-se uma intensificação do processo de ebulição do chá e consequente aceleração da redução do líquido no recipiente.



**Figura 49.** Gráficos individuais para cada ativo no ensaio de cinética de extração durante o preparo da ayahuasca (17/09/2016).

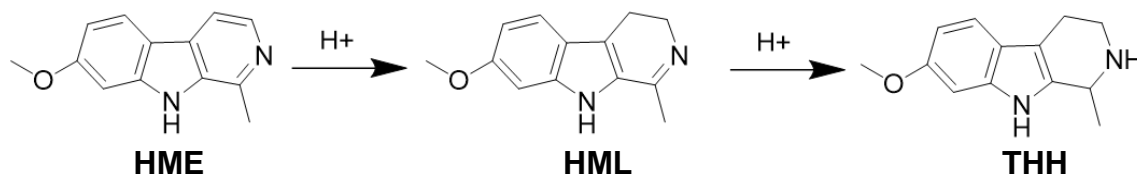


**Figura 50.** Gráficos individuais para cada ativo no ensaio de cinética de extração durante o preparo da ayahuasca (02/09/2017).

É interessante observar que em ambos os ensaios o ativo HML, após o início da fase de redução no volume do chá, apresentou um decaimento da sua concentração. Uma possível explicação para esta diminuição na concentração da HML seria a diminuição da quantidade deste ativo dissolvida no meio, ou seja, pode estar havendo precipitação do ativo devido à sua reduzida solubilidade em água.

Outra causa provável para este fenômeno seria a degradação desta substância devido ao aumento da temperatura no meio que por sua vez deve ser causada pelo efeito da dissolução de solutos no solvente (ebulioscopia). McIlhenny *et al.*, em 2009, apresentam indícios de que o aquecimento continuado e armazenamento prolongado da ayahuasca afetam de maneira não linear a proporção entre os analitos, devido possivelmente a decomposição ou interconversão dos ativos, principalmente das beta-carbolinas<sup>107</sup>. Callaway *et al.*, em 2005, também sugerem que durante o processo de decocção da ayahuasca, e devido ao seu pH naturalmente ácido, possa ocorrer a interconversão dos seus ativos, sendo possível a conversão de HME à HML

e do HML a THH<sup>91</sup>. Esta conversão ocorreria a partir da redução das beta-carbolinas em meio ácido conforme ilustrado na **Figura 51**.



**Figura 51.** Redução química da HME e HML a THH em meio ácido.<sup>91</sup>

Não fica claro pela referência se esta conversão realmente ocorre ou se pode estar havendo outro tipo de degradação na amostra durante o preparo ou armazenamento. Observando-se as moléculas e inferindo-se sobre sua estabilidade e solubilidade, seria mais esperado que a HML se oxidasse a HME ou se reduzisse a THH. Isto explicaria a baixa concentração da HML em relação às outras substâncias. Estudos futuros sobre este assunto poderão ser também muito importantes para auxiliar no preparo da ayahuasca padronizada.



## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Por meio do uso da UHPLC-MS/MS foi possível o desenvolvimento, a otimização e a validação de um método analítico eficiente e rápido, capaz de quantificar de forma simultânea, com o mínimo preparo de amostra, os quatro principais compostos ativos da ayahuasca.

Com o método otimizado e validado foram obtidos resultados confiáveis de quantificação destes compostos ativos na ayahuasca em 38 amostras provenientes do Estado de São Paulo e 39 amostras provenientes da Europa. Foi possível confirmar a heterogeneidade deste tipo de extrato, o que torna a padronização do chá para uso medicinal um grande desafio.

Uma rápida avaliação dos perfis por meio de análises por LC-MS usando a abordagem de *fingerprinting* e o tratamento estatístico, utilizando como ferramenta a PLS-DA foi realizada com todas as amostras, porém, os resultados não mostraram boa classificação em relação às informações disponíveis.

As análises por LC-MS e LC-MS/MS possibilitaram a investigação sobre a presença de possíveis adulterantes sintéticos, ou mesmo de origem natural, nas bebidas analisadas, principalmente aquelas provenientes/coletadas nos grupos ayahuasqueiros não tradicionais. Foram encontradas duas amostras contaminadas com uma substância sintética, a moclobemida. As mesmas amostras continham também psilocina, uma substância psicoativa proveniente de uma espécie de cogumelos alucinógenos muito utilizados para fins recreativos (gênero *Psilocybe*) e yuremanima, substância já relatada na literatura como componente do extrato de Jurema (*Mimosa hostilis*).

A adição de outras substâncias, mesmo que naturais, pode fazer com que a ayahuasca seja considerada como falsificada, e estas substâncias consideradas adulterantes, uma vez que nem sempre os participantes das cerimônias estão cientes da adição deste tipo de substância à bebida tradicional.

No caso da adição de substâncias sintéticas, como a moclobemida, nas bebidas de uso ritual, esta prática pode ser considerada ainda mais grave por se tratar de uma substância sintética de uso controlado. De qualquer maneira, oferecer aos participantes destes rituais, ditos cerimônias de ayahuasca, doses de um 'coquetel farmacêutico' em vez de uma bebida natural tradicional, como seria o esperado, é no mínimo antiético. Nenhum contaminante foi encontrado nas amostras da UDV ou nas

amostras do grupo da Estônia provenientes do Brasil e do grupo ayahuasqueiro Santo Daime.

Por fim, foi feito o acompanhamento do preparo real do chá em duas ocasiões distintas e a cinética de extração por meio da quantificação destes ativos foi monitorada em intervalos de tempo constantes até a obtenção do produto final. Após a análise dos resultados, foram levantados pontos importantes que poderão, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de um produto padronizado, otimizando seu preparo e reduzindo os custos de produção, tornando ainda mais viável seu uso terapêutico.

Apesar da vasta literatura relacionada à ayahuasca, um estudo deste porte, com a análise dessa quantidade de amostras reais coletadas é inédito, assim como o acompanhamento quantitativo da cinética do preparo.

Os resultados obtidos neste trabalho tornam possível a aplicação de uma ferramenta adequada para auxiliar nos estudos, tanto de produção, como nos estudos futuros de metabolômica da ayahuasca, foco dos próximos trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

A partir do acompanhamento do preparo real do chá, em duas ocasiões distintas, e do estudo da cinética de extração por meio da quantificação dos principais ativos em intervalos de tempo constantes até a obtenção do produto final forneceu informações importantes que poderão, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de um produto padronizado, otimizando seu preparo e reduzindo os custos de produção, tornando ainda mais viável seu uso terapêutico.

Este trabalho deve preceder muitos outros importantes estudos relativos à aplicação da ayahuasca como possível fitoterápico para uso em terapias psicodélicas com uso para tratamento da depressão e ansiedade, bem como auxiliar no tratamento de adictos em álcool e outras drogas.

## 6. REFERÊNCIAS

- 1 McKenna DJ, Towers GHN (1984) Biochemistry and pharmacology of tryptamines and b-carbolines: A mini review, *Journal of Psychoactive Drugs*, 16 (4), 347–358.
- 2 Riba J et al (2001) Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers, *Psychopharmacology*, 154, 85-95.
- 3 Metzner R (2006) *Sacred Vine of Spirits Ayahuasca* – edited by Ralph Metzner (online for free), Rochester, NY, Park Street Press.
- 4 Goulart S (1999) 'Contrastes e continuidades entre os grupos do Santo Daime e da Barquinha', IX Jornadas sobre Alternativas Religiosas na América Latina, Rio de Janeiro, UFRJ, 1-10.
- 5 Tupper KW (2008) The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization?, *International Journal of Drug Policy*, 19, 4, 297-303.
- 6 DOU, Edição 214, Seção 1, 08/11/2004, pg. 8 – Acesso em 28/08/2017.
- 7 Dyck E (2005) Hitting Highs at Rock Bottom': LSD Treatment for Alcoholism, 1950–1970, *Social History of Medicine*, 19, 2, 313-329.
- 8 Bogenschutz MP, Pommy JM (2012) Therapeutic mechanisms of classic hallucinogens in the treatment of addictions: from indirect evidence to testable hypotheses, *Drug Testing and Analysis*, 4, 7-8, 543-55.
- 9 Blainey MG (2015) Forbidden therapies: Santo Daime, ayahuasca, and the prohibition of entheogens in Western society, *Journal of Religion & Health*, 54, 1, 287-302.
- 10 Grob CS et al (2011) Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer, *Archives of General Psychiatry*, 68,1, 71–78.
- 11 Barbosa PCR (2011) Therapeutic perspectives acute and post-acute effects ritual ayahuasca – A case study, *The Ethnopharmacology of Ayahuasca*, 4, 65-74.

12 Thomas G et al (2013) Ayahuasca assisted therapy for addiction results from a preliminary study, *Current Drug Abuse Reviews*, 6, 1, 30-42.

13 Osório FL et al (2011) The therapeutic potential of harmine and ayahuasca in depression: evidence from exploratory animal and human studies, In: Santos RG (Editor), *The ethnopharmacology of ayahuasca*, 5, 75–85.

14 Osório FL et al (2015) Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 37, 13–20.

15 Sanches RF et al (2016) Antidepressant Effects of a Single Dose of Ayahuasca in Patients With Recurrent Depression A SPECT Study, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 36 ,1, 1-4.

16 Santos RG et al (2016) Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: a systematic literature review of animal and human studies, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38, 65–72.

17 Springob K, Kutchan TM (2009) Introduction to the different classes of natural products, Osbourn AE, Lanzotti V (Eds) *Plant-derived Natural Products*, Springer Publishers, 3-50.

18 Cordell GA (2013) Fifty years of alkaloid biosynthesis in *Phytochemistry - Review* *Phytochemistry*, 91, 29-51.

19 Schläger S, Dräger B (2016) Exploiting plant alkaloid, *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 155-164.

20 Daly JW et al (2007) Alkaloids in bufonid toads (*Melanophryniscus*): temporal and geographic determinants for two Argentinian species, *Journal Chemical Ecology*, 31, 871–887.

21 Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ (2014) Review Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 377–386.

22 Waller GR, Nowacki EK (1978) *Alkaloid biology and metabolism in plants*. Springer Publishers, 144-145.

- 23 Wiedenfeld H (2011) Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems Food Additives and Contaminants, 28, 3, 282–292.
- 24 Isah, T (2016) Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs, Pharmacognosy Review, 10, 20, 90–99.
- 25 Pan L, Blanco EJC, Kinghorn AD (2009) Plant-Derived Natural Products as Leads for Drug Discovery, Osbourn AE, Lanzotti V (Eds) Plant-derived Natural Products, Springer Publishers, 547-560.
- 26 Springob K, Kutchan TM (2009) Introduction to the different classes of natural products, Osbourn AE, Lanzotti V (Eds) Plant-derived Natural Products, Springer Publishers, 3-50.
- 27 Jacob MS, Presti DE (2005) Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine, Medical Hypotheses 64, 930–937.
- 28 Szabo A et al (2014) N,N-Dimethyltryptamine and 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine Modulate Innate and Adaptive Inflammatory Responses through the Sigma-1 Receptor of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells, PLOS ONE 9, 8, 1-12.
- 29 Szabo A et al (2016) The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary iPSC-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells, Frontiers in Neuroscience, 10, 423.
- 30 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC Nº 192, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2017 - Publicada no DOU nº 237, de 12 de dezembro de 2017.
- 31 INCB, 2010 obtido em <https://www.incb.org/incb/en/publications/annual-reports/annual-report-2010.html> acesso em 30-01-2018 parágrafo 284.
- 32 Bouso JC et al, (2017) Ayahuasca Technical Report, ICEERS - International Center for Ethnobotanical Education, Research & Service, 1-18.
- 33 Tittarelli R et al (2015) Recreational Use, Analysis and Toxicity of Tryptamines, Current Neuropharmacology, 13, 1, 26–46.

- 34 Strassman RJ, Qualls CR (1994) Dose-response study of N,N-dimethyltryptamine in humans. I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects, *Archives of General Psychiatry*, 51, 2, 85-97.
- 35 Strassman RJ et al (1994) Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans: II. Subjective Effects and Preliminary Results of a New Rating Scale *Archives of General Psychiatry*, 51,2, 98-108.
- 36 Shulgin AT (1976) DMT & TMA-2, *Journal of Psychedelic Drugs* 8 (2), 167-169.
- 37 McKenna DJ, Towers GHN, Abbott F (1984) Monoamine Oxidase Inhibitors in South American Hallucinogenic Plants: Tryptamine and b-Carboline Constituents of Ayahuasca, *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 195-223.
- 38 Gallimore AR, Strassman RJ (2016) A Model for the Application of Target-Controlled Intravenous Infusion for a Prolonged Immersive DMT Psychedelic Experience, *Frontiers in Pharmacology*, 7, 1-11.
- 39 Ott J (1999) Pharmahuasca: Human Pharmacology of Oral DMT Plus Harmine, *Journal of Psychoactive Drugs*, 31, 2, 171–177.
- 40 Gable RS (2007) Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids, *Addiction*, 102, 24–34.
- 41 Gillin JC et al (1976) 5-methoxy- N,N-dimethyltryptamine: behavioral and toxicological effects in animals. *Biological Psychiatry*, 11, 355–358.
- 42 Cao R et al (2007) beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry* 14, 4, 479-500.
- 43 Bouso JC et al (2013) Acute effects of ayahuasca on neuropsychological performance: differences in executive function between experienced and occasional users, *Psychopharmacology*, 230, 415–424.
- 44 Halpern JH et al (2008) Evidence of health and safety in American members of a religion who use a hallucinogenic sacrament. *Medical Science Monitor* 14, 15–22.

- 45 Klein T et al (2009) Fitoterápicos: um mercado promissor Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 30, 3, 241-248.
- 46 Santos RG (2010) Toxicity of chronic ayahuasca administration to the pregnant rat: how relevant it is regarding the human, ritual use of ayahuasca? Birth Defects Research, 89, 6, 533-535.
- 47 Barbosa PCR et al (2016) Psychological and neuropsychological assessment of regular hoasca users, Comprehensive Psychiatry, 71, 95-105.
- 48 Santos RG (2013) Safety and Side Effects of Ayahuasca in Humans—An Overview Focusing on Developmental Toxicology, Journal of Psychoactive Drugs, 45,1, 68–78.
- 49 Sklerov J et al. (2005) A fatal intoxication following the ingestion of 5 methoxy-dimethyltryptamine in an ayahuasca preparation, Journal of Analytical Toxicology, v.29 838-841.
- 50 Warren RJ (2004) Fatal intoxication resulting from the ingestion of 'ayahuasca', Journal of Analytical Toxicology, 28, 287-92.
- 51 Maldaner L, Jardim ICSF (2009) O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, Química Nova 32, 1, 214-222.
- 52 Oshita D, Jardim, ICSF (2015) Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. Química Nova, 38, 10, 1273-1281.
- 53 Rodrigues MVN et al (2006) O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais, MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais, 7, 5.
- 54 Collins CH, Braga GL, Bonato, PS (2006) Fundamentos de Cromatografia. 1a. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1-453.
- 55 Pedroso MP et al (2009) Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC x GC). Química Nova, 32, 421-430.
- 56 Maldaner L, Jardim ICSF (2012) UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes, Scientia Chromatographica, 4, 3, 197-205.

- 57 Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88, 20, 4451–4459.
- 58 Colton R, D'Agostino A, Traeger JC (1995) Electrospray mass spectrometry applied to inorganic and organometallic chemistry. *Mass Spectrometry Reviews*, 14, 79–106.
- 59 El-Baba TJ et al (2017) Melting Proteins: Evidence for Multiple Stable Structures upon Thermal Denaturation of Native Ubiquitin from Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Measurements, *Journal of the American Chemical Society*, 139, 18, 6306–6309.
- 60 Forsberg E, Fang M, Siuzdak G (2017) Staying Alive: Measuring Intact Viable Microbes with Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28, 1, 14–20.
- 61 Ho CS et al (2003) Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *The Clinical Biochemist Reviews* 24, 1, 3-12.
- 62 [https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass\\_sp](https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp)  
[acesso em 09/10/2018](#)
- 63 Vesecchi R et al, Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Química Nova*, 34, 10, 1875-1887.
- 64 Mobin M et al (2017) Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry Analysis and Vasorelaxant Effect of Essential Oil from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., *BioMed Research International*, 2017, 1-6.
- 65 Botitsi H, Economou A, Tsipi, D (2007) Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1685–1695.
- 66 Wang EH, Combe PC, Schug KA (2016) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 5, 886-896.
- 67 Herderich M et al (1997) Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products, *Chromatographia*, 45, 1, 127–132.



68 Schimdt A, Picotti R, Aebersold P (2008) Proteomeanalyse und systembiologie, BIOSpektrum, 14, 44-46.

69 Website da empresa sciex - <https://sciex.com/community/support-community/faqs-and-discussions/analyst/general-analyst-questions/what-is-the-dwell-time> - (2004) acesso em 09/02/2018.

70 Website da empresa waters - MRM Inter-channel Crosstalk, Waters Technical Note, disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000917en.pdf> acesso em 09/02/2018.

71 Sawaya ACH et al (2004) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis, Analyst, 129, 739-744.

72 Draper J et al (2013) Flow infusion electrospray ionisation mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting: a review, Metabolomics, 9, S4 – S29.

73 Vogel, AI et al (2002) Análise Química Quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p. 77.

74 Marçó, PH, Valderrama, P., Alexandrino, G. L., Poppi, R. J., Tauler, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. Quim. Nova 37, 1525–1532 (2014).

75 Brereton RG, Lloyd GR (2014) Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away, Journal of Chemometrics, 28, 213–225.

76 Pomerantsev AL, Rodionova, OY (2018) Multiclass partial least squares discriminant analysis: Taking the right way—A critical tutorial, Journal of Chemometrics, 1-16

77 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2011) Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília.

78 DOQ-CGCRE 008, INMETRO (2016) "Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos" Rio de Janeiro, Brasil, Revisão 5.

79 Ribani M et al (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, Química Nova, 27, 5, 771-80.

80 Brito NM et al (2003) Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão, Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 13, 129-46.

81 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

82 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº166, de 25 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos.

83 [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicados-criterios-de-validacao-de-metodos-analiticos/219201?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicados-criterios-de-validacao-de-metodos-analiticos/219201?inheritRedirect=false), acesso em 08/02/2018.

84 <http://kodu.ut.ee/~hellex/aya/Ayaeng.htm> acesso em 15/10/2017.

85 Cardoso, MHW et al (2010) Validação de Método para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Tomate: Uma Experiência Laboratorial, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 30, 63-72.

86 Sell I (2005) Utilização da regressão linear como ferramenta de decisão na gestão de custos - Universidade Federal de Santa Catarina - IX Congresso Internacional de Custos - Florianópolis, SC, Brasil

87 Aragão NM, Veloso MCC, Andrade JB (2009) Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "química verde" na determinação de metilxantinas em bebidas, Química Nova, 32, 9, 2476 – 2481.

88 Teixeira DC et al (2008) Uso e manejo de plantas ritualísticas na comunidade do Santo Daime em Galdinópolis, Nova Friburgo/RJ Brasil. Revista de Ciências da Vida, v. 28, 2, 63-74.

89 DeKorne J, Aardvark D, Trout K (2002) Ayahuasca analogues and plant-based tryptamines - The best of the entheogen review 1992–1999, Second Edition.

- 90 Pires AP et al (2009) Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage, *Phytochemical Analysis*, 20, 2, 149-53.
- 91 Callaway JC (2005) Various Alkaloid Profiles in Decoctions of *Banisteriopsis caapi*, *Journal of Psychoactive Drugs*, 37, 2, 151.
- 92 Gambelunghe C et al (2008) Identification of N,N-dimethyltryptamine and beta-carbolines in psychotropic ayahuasca beverage, *Biomedical Chromatography*, 22, 1056-1059.
- 93 McIlhenny EH et al (2012) Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood, *Biomedical Chromatography*, 26, 3, 301–313.
- 94 Gaujac A et al (2013) Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry, *Talanta*, 106, 394-398.
- 95 Lanaro R et al (2015) ritualistic use of ayahuasca versus street use of similar substances seized by the police: a key factor involved in the potential for intoxications and overdose? *Journal of Psychoactive Drugs*, 47, 2, 132–139.
- 96 Callaway JC, Brito GS, Neves ES (2005) Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*, *Journal of Psychoactive Drugs*, 37, 2, 145.
- 97 <http://www.metaboanalyst.ca/>
- 98 Ogunbodede B et al (2010) New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) (“San Pedro”) and their relevance to shamanistic practice, *Journal of Ethnopharmacology* 131, 356–362.
- 99 Anderson BT et al (2012) Statement on ayahuasca. *International Journal of Drug Policy*, 23, 3, 173-175.
- 100 Santos RG et al (2016) Classical hallucinogens and neuroimaging: A systematic review of human studies: Hallucinogens and neuroimaging, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 715-728.

- 101 Gaujac A (2013) Estudos sobre o psicoativo N,N-dimetiltriptamina (DMT) em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir et em bebidas consumidas em contexto religioso – Tese de Doutorado.
- 102 Danish University Antidepressant Group (1993) Moclobemide: a reversible MAO-A-inhibitor showing weaker antidepressant effect than clomipramine in a controlled multicenter study, *Journal of Affective Disorders*, 28, 2, 105-16.
- 103 Froese T, Guzmán G, Guzmán-Dávalos, L (2016) On the Origin of the Genus *Psilocybe* and Its Potential Ritual Use in Ancient Africa and Europe, *Economic Botany*, 70, 103.
- 104 Björnstad K, Helander A, Beck O (2008) Development and clinical application of an LC-MS-MS method for mescaline in urine, *Journal of Analytical Toxicology*, 32, 3, 227-31.
- 105 Vepsäläinen JJ et al (2005) Isolation and characterization of yuremamine, a new phytoindole, *Planta Medica*, 71, 11, 1053-7.
- 106 Martin R et al (2013) Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS, *International Journal of Legal Medicine*, 127, 3, 593.
- 107 McIlhenny EH et al (2009) Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 1216, 51, 8960-8968.

## 7. ANEXOS

**Tabela 1.** Quantificação dos ativos nas amostras analisadas - concentração em mg/L, desvio padrão (**DP**) e coeficiente de variação percentual (**CV**) – valor médio de triplicata de preparo

Amostras	DMT			THH			HME			HML		
	Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
CAST_270516_1	80,0	6,9	8,7	1217,3	55,5	4,6	1193,3	52,5	4,4	128,0	6,9	5,4
CAST_270516_2	82,7	2,3	2,8	1136,0	13,9	1,2	1245,3	20,0	1,6	132,0	0,0	0,0
CAST_270516_3	82,7	2,3	2,8	1260,0	14,4	1,1	1148,0	17,3	1,5	125,3	4,6	3,7
NEE_210516_1	68,7	1,2	1,7	825,3	6,1	0,7	844,0	3,3	0,4	64,0	0,0	0,0
NEE_210516_2	69,3	3,1	4,4	829,3	32,1	3,9	798,7	22,2	2,8	66,7	4,6	6,9
NEE_210516_3	68,0	2,0	2,9	830,7	6,1	0,7	844,0	3,3	0,4	64,0	0,0	0,0
Lupu_180616_1	190,7	4,6	2,4	656,0	8,0	1,2	896,0	18,2	2,0	48,0	0,0	0,0
Lupu_180616_2	181,3	12,2	6,7	636,0	30,2	4,8	845,3	19,7	2,3	45,3	2,3	5,1
Lupu_180616_3	197,3	6,1	3,1	738,7	20,5	2,8	866,7	34,6	4,0	45,3	2,3	5,1
NAC_111115_3	65,3	3,1	4,7	402,7	8,3	2,1	549,3	11,5	2,1	48,0	2,0	4,2
NAC_122015_1	189,3	2,3	1,2	560,0	14,4	2,6	825,3	13,6	1,7	53,3	2,3	4,3
NAC_250316_2	321,3	12,2	3,8	741,3	30,6	4,1	712,0	31,2	4,4	56,0	4,0	7,1
NMG_280616_1	117,3	2,3	2,0	577,3	4,6	0,8	660,0	5,7	0,9	60,0	0,0	0,0
NMG_280616_2	126,7	2,3	1,8	624,0	4,0	0,6	734,7	5,0	0,7	65,3	2,3	3,5
NMG_280616_3	101,3	4,6	4,6	514,7	16,7	3,2	589,3	18,0	3,1	50,7	2,3	4,6
NRA_062016_1	105,3	2,3	2,2	1321,3	2,3	0,2	1700,0	6,5	0,4	149,3	2,3	1,6
NRA_062016_3	129,3	6,1	4,7	1470,0	80,5	5,5	1717,3	33,4	1,9	154,7	4,6	3,0
NRA_082015_2	62,0	2,0	3,2	673,3	6,1	0,9	549,3	6,8	1,2	61,3	15,1	24,7
SAMA_240716	93,3	2,3	2,5	1205,3	9,2	0,8	1816,0	6,5	0,4	157,3	2,3	1,5
SAMA_180616	109,3	4,6	4,2	648,0	18,3	2,8	906,7	18,9	2,1	89,3	4,6	5,2
SAMA_170616	340,0	10,6	3,1	666,7	20,5	3,1	1108,0	31,5	2,8	44,0	0,0	0,0
SJB020716_1	165,3	6,1	3,7	740,0	26,2	3,5	1160,0	31,2	2,7	70,7	2,3	3,3
SJB020716_2	158,7	2,3	1,5	701,3	15,1	2,2	1146,7	14,7	1,3	68,0	0,0	0,0
SJB020716_3	162,7	2,3	1,4	722,7	10,1	1,4	1192,0	19,9	1,7	70,7	2,3	3,3
NRD_160616_2	120,0	4,0	3,3	1022,7	10,1	1,0	1330,7	5,0	0,4	132,0	0,0	0,0
NRD_160616_1	120,0	4,0	3,3	973,3	10,1	1,0	1401,3	12,4	0,9	128,0	17,4	13,6
NPE_270915_1	68,0	0,0	0,0	857,3	8,3	1,0	965,3	3,8	0,4	106,7	2,3	2,2
NPE_160416_2	116,0	6,9	6,0	580,0	28,8	5,0	501,3	23,2	4,6	48,0	4,0	8,3
NAC_160916_1	241,3	8,3	3,5	1182,7	26,6	2,3	1041,3	28,5	2,7	129,3	2,3	1,8
NAC_170916_1	254,7	2,3	0,9	1176,0	14,4	1,2	1177,3	16,4	1,4	122,7	2,3	1,9
NAC_170916_5	325,3	15,1	4,7	1144,0	47,2	4,1	1445,3	46,9	3,3	124,0	6,9	5,6
NRD_180916_T	114,7	4,6	4,0	565,3	20,5	3,6	746,7	29,3	3,9	72,0	4,0	5,6
NRD_180916_TC	136,0	4,0	2,9	837,3	9,2	1,1	986,7	14,7	1,5	116,0	4,0	3,5
NRD_150616_TC	244,0	8,0	3,3	1117,3	20,1	1,8	1406,7	18,9	1,3	150,7	2,3	1,5
NDM_201116_T	133,3	24,1	18,1	840,0	114,5	13,6	414,7	62,2	15,0	57,3	12,2	21,3
NDM_201116_TC	140,0	10,6	7,6	1032,0	59,2	5,7	878,7	50,0	5,7	117,3	8,3	7,1
NGV_030916_1	132,0	0,0	0,0	1898,0	143,8	7,6	1084,0	15,0	1,4	161,3	2,3	1,4
NGV_030916_2	140,0	17,4	12,5	3088,0	324,7	10,5	1412,0	109,2	7,7	392,0	42,1	10,8

**Tabela 2.** Quantificação dos ativos nas amostras analisadas provenientes da Europa  
 - concentração em mg/L, desvio padrão (**DP**) e coeficiente de variação percentual  
 (**CV**) - valor médio de triplicata de preparo

	DMT			THH			HME			HML		
Amostras	Média	DP	CV %	Média	DP	CV %	Média	DP	CV %	Média	DP	CV %
AM EST 1	751,7	16,1	2,1	390,0	8,7	2,2	646,7	18,9	2,9	27,5	0,9	3,2
AM EST 2	88,3	3,2	3,6	90,0	7,5	8,4	555,3	10,1	1,8	6,9	0,4	5,2
AM EST 3	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ	< LoQ
AM EST 4	888,3	27,5	3,1	1433,3	70,8	4,9	2141,7	94,4	4,4	80,0	5,0	6,3
AM EST 5	307,0	11,4	3,7	310,0	10,5	3,4	704,0	22,5	3,2	31,3	0,6	1,8
AM EST 6	669,3	12,9	1,9	1274,7	19,7	1,5	1725,3	38,9	2,3	66,7	2,3	3,5
AM EST 7	600,0	40,0	6,7	497,3	22,0	4,4	2146,7	194,7	9,1	53,3	6,1	11,5
AM EST 8	936,7	20,8	2,2	948,3	30,1	3,2	863,3	31,8	3,7	48,1	1,4	2,8
AM EST 9	411,7	7,6	1,9	388,3	27,5	7,1	391,7	17,6	4,5	240,0	8,7	3,6
AM EST 10	4,6	0,4	8,3	15,3	1,1	7,4	64,9	4,8	7,4	101,6	5,5	5,4
AM EST 11	536,0	12,0	2,2	456,0	6,9	1,5	1188,0	12,0	1,0	19,2	1,0	5,4
AM EST 12	653,3	24,4	3,7	570,7	39,5	6,9	1288,0	69,7	5,4	274,7	18,5	6,7
AM EST 13	1186,7	4,6	0,4	333,3	18,5	5,5	800,0	36,7	4,6	50,7	0,6	1,1
AM EST 14	1493,3	59,0	3,9	2626,7	84,8	3,2	2421,3	95,4	3,9	173,3	4,6	2,7
AM EST 15	1093,3	60,0	5,5	51,2	4,5	8,8	37,3	4,5	12,2	< LoQ	< LoQ	< LoQ
AM EST 16	776,7	12,6	1,6	1705,0	44,4	2,6	2315,0	72,6	3,1	143,3	2,9	2,0
AM EST 17	1608,0	44,5	2,8	805,3	18,5	2,3	2440,0	64,0	2,6	90,0	0,0	0,0
AM EST 18	193,3	12,9	6,7	305,3	34,0	11,1	746,7	52,8	7,1	17,3	2,3	13,3
AM EST 19	1645,0	37,7	2,3	870,7	41,1	4,7	2094,7	87,3	4,2	72,0	4,0	5,6
AM EST 20	652,0	84,0	12,9	1266,7	170,7	13,5	342,0	14,6	4,3	25,7	1,2	4,6
AM EST 21	906,7	44,1	4,9	2986,7	129,6	4,3	3080,0	152,0	4,9	173,3	12,2	7,1
AM EST 22	608,0	45,4	7,5	642,7	50,3	7,8	712,0	86,6	12,2	36,0	1,0	2,8
AM EST 23	668,0	77,1	11,5	1324,0	180,8	13,7	2000,0	244,6	12,2	148,0	21,2	14,3
AM EST 24	1293,3	32,3	2,5	610,7	20,1	3,3	1085,3	9,2	0,9	< LoQ	< LoQ	< LoQ
AM EST 25	1725,0	30,0	1,7	24,0	2,5	10,2	58,2	5,5	9,4	< LoQ	< LoQ	< LoQ
AM EST 26	573,3	19,7	3,4	736,0	30,2	4,1	944,0	58,9	6,2	49,3	2,3	4,7
AM EST 27	366,7	4,6	1,3	313,3	14,0	4,5	400,0	24,3	6,1	12,1	2,8	22,8
AM EST 28	1128,0	24,0	2,1	930,7	25,7	2,8	1421,3	37,8	2,7	< LoQ	< LoQ	< LoQ
AM EST 29	1344,0	8,0	0,6	3874,7	85,5	2,2	4440,0	50,0	1,1	386,7	9,2	2,4
AM EST 30	1698,7	46,2	2,7	1192,0	21,2	1,8	1957,3	44,1	2,3	40,0	0,0	0,0
AM EST 31	628,0	21,2	3,4	1076,0	36,7	3,4	717,3	30,0	4,2	49,3	2,3	4,7
AM EST 32	810,7	24,4	3,0	2256,0	69,7	3,1	4032,0	92,3	2,3	173,3	4,6	2,7
AM EST 33	456,0	13,9	3,0	1334,7	36,3	2,7	966,7	46,0	4,8	94,7	4,6	4,9
AM EST 34	1538,7	33,3	2,2	3861,3	136,3	3,5	3386,7	124,0	3,7	354,7	16,7	4,7
AM EST 35	592,0	25,0	4,2	1182,7	68,9	5,8	820,0	55,6	6,8	80,0	8,0	10,0
AM EST 36	757,3	11,5	1,5	1665,3	18,9	1,1	1354,7	23,4	1,7	68,0	0,0	0,0
AM EST 37	726,7	30,0	4,1	1830,7	72,0	3,9	1782,7	84,9	4,8	181,3	9,2	5,1
AM EST 38	702,7	19,7	2,8	1240,0	44,0	3,5	1370,7	48,4	3,5	57,3	2,3	4,0
AM EST 39 A	948,3	38,8	4,1	1360,0	83,2	6,1	2031,7	105,6	5,2	61,7	2,9	4,7
AM EST 39 B	955,0	63,8	6,7	1385,0	86,7	6,3	2080,0	152,6	7,3	68,3	7,6	11,2